

**Funciones de las proteínas Spalt e identificación de sus genes diana  
durante el desarrollo del disco imaginal de ala de *Drosophila*  
*melanogaster***

María Fernández Organista

Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid  
Madrid 2012





Departamento de Biología Molecular  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid

**Funciones de las proteínas Spalt e identificación de sus genes diana  
durante el desarrollo del disco imaginal de ala de *Drosophila*  
*melanogaster***

Memoria presentada por María Fernández Organista para optar al grado  
de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid  
2012

Director de Tesis:  
José Félix de Celis Ibeas

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”  
(CSIC-UAM)  
Facultad de Ciencias  
Universidad Autónoma de Madrid



**A mis Padres, a mis Hermanas  
y a Manuela**



## Summary

The *Drosophila* genes *spalt major (salm)* and *spalt-related (sal-r)* encode conserved Zn-finger transcription factors which expression is regulated by the Decapentaplegic (Dpp) signalling pathway in the wing imaginal disc. The Sal proteins are required for the positioning of the longitudinal veins and the establishment of cellular affinities in the central region of the wing blade epithelium, processes that are also regulated by the Dpp pathway. In this work, we have analysed the functional requirements of *sal* genes during wing development, identifying to what extent they mediate the functions of the Dpp pathway in this developmental system. We identified novel functions of Sal proteins in the regulation of the G2/M transition, cell survival and epithelial integrity. We also find that *sal* and *optomotor blind*, which expression is also regulated by the Dpp pathway in the wing disc, act independently of each other.

The Spalt proteins act as transcription factors, most likely regulating gene expression by repression, but the identity of their target genes is still unknown. We have compared the expression profiles of *sal/salr* mutant wing discs with control discs, using microarrays, with the aim of identifying candidate Sal/Salr targets. The analysis of the expression pattern of a fraction of the selected genes identified 23 genes that could be repressed by Sal/Salr and 19 that could be activated by them. Finally, we analysed the loss-of-function phenotype in the wing of 491 selected genes, and, discarding those whose loss-of-function does not modify wing morphology, a 66% show a phenotype similar to the loss or over-expression of the *sal* genes.



## Resumen

Los genes del complejo génico *spalt* (*sal*) de *Drosophila*, *spalt major* (*sal<sup>m</sup>*) y *spalt-related* (*sal-r*), codifican para factores de transcripción que se caracterizan por tener varios pares de dedos de Zn conservados, y su expresión en el disco imaginal de ala está regulada por la ruta de señalización Decapentaplegic (Dpp). Las proteínas Sal son necesarias para el posicionamiento de las venas longitudinales y establecimiento de afinidades celulares en el epitelio de la región central del disco imaginal de ala, aspectos que son también regulados por la ruta Dpp. En este trabajo, se ha profundizado en el análisis de los requerimientos funcionales de los genes *sal*, identificando en qué funciones de la ruta de señalización Dpp participan durante el desarrollo del ala. Hemos identificado nuevas funciones de las proteínas Sal en la regulación de la transición G2/M, supervivencia celular e integridad epitelial. También, observamos que *sal* y *optomotor blind*, cuya expresión está también regulada por la ruta Dpp en el disco imaginal de ala, actúan independientemente uno del otro.

Las proteínas Sal funcionan como factores de transcripción, posiblemente como represores, aunque no se conocen aún sus genes diana. En este trabajo hemos comparado mediante microarrays los perfiles de expresión de discos imaginales de ala mutantes para los genes *sal/sal<sup>r</sup>* con discos control con el objetivo de identificar genes candidatos a ser regulados por las proteínas Sal/Sal<sup>r</sup>. Mediante el análisis del patrón de expresión de una fracción de los genes seleccionados mediante los microarrays, se identificaron 23 genes que podrían ser reprimidos por Sal/Sal<sup>r</sup> y 19 que podrían ser activados. Además, se analizaron los fenotipos de falta de función en el ala de 491 de los genes seleccionados mediante los microarrays y, exceptuando los genes cuya falta no presenta variaciones en la morfología del ala, el 66% muestran un fenotipo similar a la falta de función o sobre-expresión de los genes *sal*.





## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Generación de patrones organizados	3
2. <i>Drosophila melanogaster</i> como organismo modelo en el estudio de la formación de patrones	4
3. Los discos imaginales	5
4. Formación de patrón en el disco imaginal de ala	6
5. La ruta de señalización Decapentaplegic (Dpp)	9
6. El complejo génico <i>spalt</i>	10
<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
1. Cultivo de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
2. Estirpes de <i>Drosophila melanogaster</i>	21
3. Análisis clonal	23
3.1. Análisis clonal utilizando recombinación mitótica inducida por <i>FLP</i>	23
3.2. Inducción de tejidos clonales con el sistema <i>Gal4/UAS-FLP</i>	24
3.3. Inducción de tejidos clonales mediante rayos X	25
4. Tinciones inmunohistoquímicas	25
5. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo	25
6. Microarrays	26
7. Generación de sondas de ARN	26
7.1. Generación de sondas de ARN a partir de ADNc	26
7.2. Generación de sondas de ARN a partir de producto de PCR	27
8. Hibridaciones <i>in situ</i>	28
9. Preparación de discos imaginales y tratamiento de imágenes	28
10. Preparación de alas adultas y cuantificación del tamaño del ala	28
11. Análisis estadístico	29
12. Cálculo del índice mitótico en discos imaginales	29
13. Análisis bioinformático de regiones reguladoras	29
<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
1. Análisis de las funciones de <i>Sal</i> durante el desarrollo del ala	35
1.1. Fenotipos asociados a la falta y sobre-expresión de los genes <i>sal</i> en el ala	35

1.2. Análisis de la falta de función mediante interferencia génica de los genes <i>sal</i> : UAS-dicer; <i>sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+</i>	36
1.3. Papel de las proteínas Sal en la proliferación celular	38
1.3.1. Análisis clonal de la deficiencia de los genes <i>sal</i> : <i>Df(2L)32FP5</i>	38
1.3.2. Análisis de la reducción de la expresión de los genes <i>sal</i> : UAS-dicer; <i>sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+</i> en la proliferación celular	42
1.4. Papel de las proteínas Sal en el control de la muerte celular	44
1.5. Función de las proteínas Sal en el mantenimiento de la integridad epitelial	46
2. Relación entre la ruta de señalización Dpp y los genes <i>sal</i>	51
2.1. Análisis de la participación de las proteínas Sal en la función de Dpp en el ala	52
2.1.1. Estudio de las consecuencias de la falta de función de la ruta Dpp en combinación con la sobre-expresión de las proteínas Sal	53
2.1.1.1. Reducción de la expresión de Mad en combinación con la sobre-expresión de Sal	53
2.1.1.2. Aumento de la expresión de Brk en combinación con la sobre-expresión de Sal	54
2.1.2. Estudio de las consecuencias del exceso de función de la ruta Dpp en combinación con la falta de función de las proteínas Sal	56
2.1.2.1.1. Rescate por Sal de los fenotipos producidos por condiciones de falta y exceso de Tkv	56
2.1.2.1.2. Análisis de la sobre-expresión de Dpp en combinación con la reducción de la expresión de <i>sal</i>	59
3. Relación funcional entre <i>sal</i> y <i>omb</i>	60
3.1. Descripción de la interferencia génica del gen <i>omb</i>	61
3.2. Análisis del efecto de la interferencia génica del gen <i>omb</i> en combinación con la sobre-expresión del gen <i>salm</i>	61
3.3. Estudio de la interferencia génica del gen <i>omb</i> en combinación con una forma activada del receptor Tkv y su relación con los genes <i>sal</i>	62
3.4. Relación entre el gen <i>omb</i> y los genes <i>sal</i> en el mantenimiento de la integridad epitelial	64

4. Búsqueda de genes diana de las proteínas Sal y Salr	66
4.1. Análisis de la expresión génica en individuos con falta o sobre-expresión de las proteínas Sal: microarrays	66
4.2. Análisis de los patrones de expresión de los genes identificados en los experimentos de microarrays mediante hibridaciones <i>in situ</i>	95
4.3. Estudio de regiones reguladoras mediante análisis bioinformático	111
4.4. Análisis de la falta de función mediante ARN interferente de los genes identificados en los microarrays	113
<b>DISCUSIÓN</b>	139
1. Función de las proteínas Sal durante el desarrollo del ala	142
1.1. Papel de las proteínas Sal en el mantenimiento de la integridad epitelial y afinidades celulares en la región central del ala y su relación con la ruta de señalización Dpp	142
1.2. Función de Sal en la división celular y su relación con la ruta Dpp	143
1.3. Función de Sal en la supervivencia celular	144
1.4. Sal no participa en la diferenciación de venas mediada por la ruta Dpp	144
2. <i>omb</i> y los genes <i>sal</i>	145
3. Análisis de los perfiles de expresión génica en discos imaginales de ala mediante microarrays	145
3.1. Resultados de los microarrays de falta y ganancia de función de los genes <i>sal</i>	146
3.2. Patrones de expresión de los genes identificados	146
3.3. Sitios de unión al ADN de los factores de transcripción Sal	147
3.4. Fenotipos de falta de función de los genes encontrados en los microarrays	147
3.4.1. Clasificación de los genes según su fenotipo	147
3.4.2. Relación de los fenotipos encontrados con los patrones de expresión de los genes analizados	148
3.4.3. Relación de los fenotipos encontrados y las clases moleculares de los genes	148
<b>CONCLUSIONES</b>	151
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	157

<b>ANEXO I</b>	171
<b>ANEXO II</b>	203
<b>ABREVIATURAS</b>	245
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	251





## Introducción





La Biología del desarrollo estudia la formación de organismos pluricelulares a partir de una única célula denominada cigoto. El cigoto se divide durante el desarrollo embrionario y genera las células que darán lugar a las diversas estructuras que aparecen en el organismo adulto. Todos los procesos celulares que ocurren durante la embriogénesis, tales como la migración, división y diferenciación celular, ocurren bajo el control del genoma para definir los distintos patrones organizados.

### **1. Generación de patrones organizados**

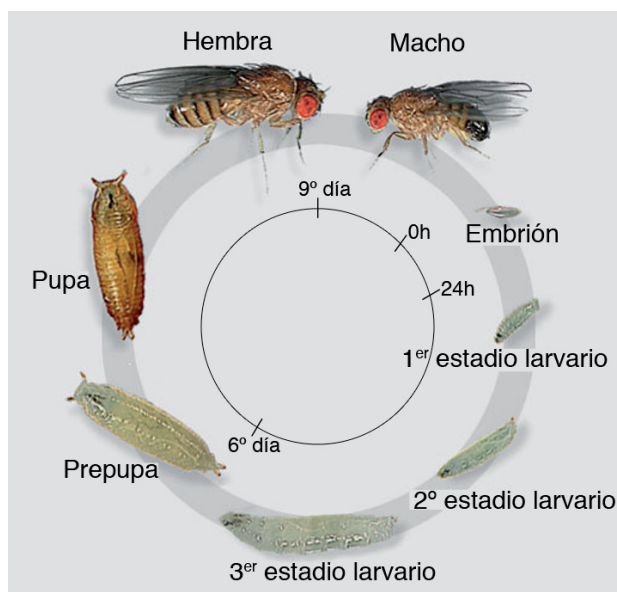
La formación de los distintos patrones organizados que encontramos dentro de un organismo requiere de la regulación espacial y temporal de la expresión génica. Mediante procesos de regulación transcripcional se generan los dominios de expresión que subyacen al desarrollo de los organismos multicelulares (Arnone and Davidson, 1997). Unos de los sistemas moleculares implicados en el control de la expresión génica son las rutas de señalización. La activación diferencial de cada ruta de señalización y la consecuente expresión de sus factores de transcripción asociados a patrones espaciales y temporales, regulan la división celular, muerte celular, migración, diferenciación y crecimiento, y de esta manera la formación de los distintos tejidos y órganos durante el desarrollo. La generación de patrones de expresión ocurre durante el desarrollo de todos los organismos multicelulares, como por ejemplo durante el desarrollo de las extremidades y en la generación de la diversidad celular en el tubo neural

de los vertebrados (Lupo et al., 2006), y en la formación de los ejes dorsal-ventral y anterior-posterior del embrión de *Drosophila melanogaster* (Moussian and Roth, 2005).

Entender cómo actúan las diferentes rutas de señalización en la regulación de la expresión génica y de los comportamientos celulares no sólo tiene interés desde el punto de vista de la biología del desarrollo, sino que también presenta importantes aspectos biomédicos. Así, el funcionamiento incorrecto de estas rutas, causado por mutaciones en sus componentes, resulta en un gran número de defectos en el desarrollo y patologías en humanos (Molnar et al., 2011). A pesar de la variedad morfológica que muestran los diferentes organismos, los procesos celulares y los genes que los regulan están básicamente conservados. Esto nos permite que, para entender las bases genéticas y celulares implicadas en la formación de patrones morfológicos, tanto en vertebrados como en invertebrados, se hayan utilizado a lo largo de la historia organismos modelo que permiten una fácil manipulación experimental.

## **2. *Drosophila melanogaster* como organismo modelo en el estudio de la formación de patrones**

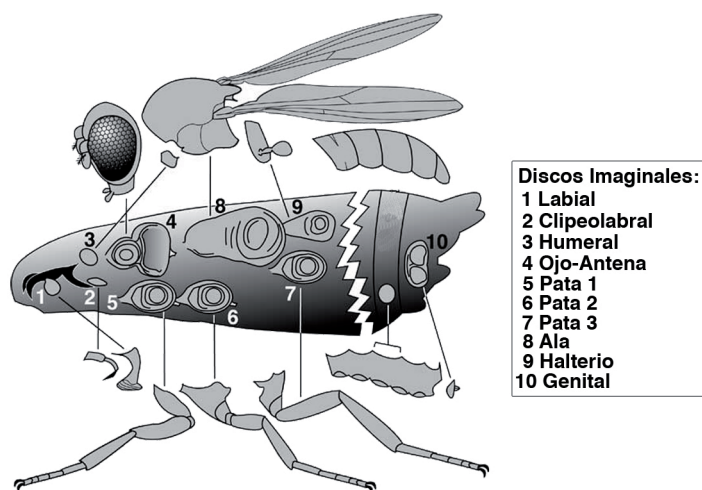
Uno de los organismos modelo más utilizado en estudios de genética del desarrollo es *Drosophila melanogaster*, conocida comúnmente como la “mosca del vinagre”. *Drosophila* posee varias características que han hecho posible su uso como organismo modelo. Su genoma tiene una baja complejidad y se puede manipular fácilmente, su tiempo de generación es corto (Figura 1), y en cada generación produce una progenie numerosa. A estas características se le suma la mencionada conservación en las secuencias codificantes entre *Drosophila* y otros organismos, incluido el humano (Adams et al., 2000). Uno de los aspectos en los que *Drosophila* se ha revelado como organismo experimental particularmente útil son la identificación de los distintos componentes de cada ruta de señalización y el análisis de los mecanismos moleculares y celulares de su funcionamiento. La señalización celular ha sido analizada en distintos estadios del desarrollo y en distintas estructuras de *Drosophila*. Ejemplos de ello son los estudios realizados durante el desarrollo de los discos imaginales, que han sido fundamentales en el análisis de la regulación de la actividad de las rutas de señalización durante el desarrollo de tejidos epiteliales (Molnar et al., 2011).



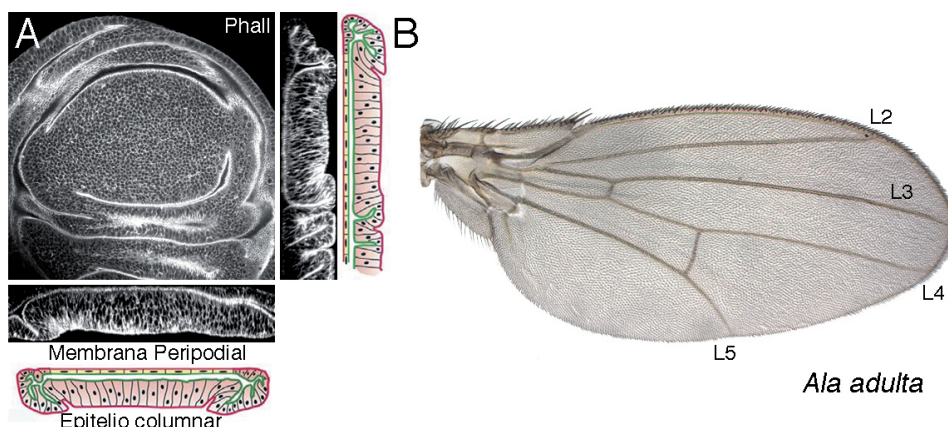
**Figura 1. Ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.** Imágenes de las diferentes fases del desarrollo de *Drosophila*. Tras 24 horas de desarrollo embrionario (Embrión), la larva sufre dos mudas que separan tres fases larvarias (1º, 2º y 3º estadio larvario o larva I, II y III). La fase pupal se inicia el 6º día (Prepupa) y dura tres días (Pupa). Modificado de FlyMove (<http://flymove.uni-muenster.de/>).

### 3. Los discos imaginales

Los discos imaginales son estructuras epiteliales que dan lugar a la mayoría de las estructuras externas de la mosca (Figura 2). Cada disco imaginal comienza su desarrollo a partir de un grupo de células precursoras del ectodermo embrionario (Cohen et al., 1993). Durante el desarrollo larvario, los primordios invaginan dando lugar a sacos epiteliales formados por dos capas: Un epitelio escamoso llamado epitelio peripodial o membrana peripodial, requerido para la eversión de los discos durante la metamorfosis (Fristrom, 1993; Pastor-Pareja et al., 2004), y un epitelio columnar pseudoestratificado que dará lugar a las estructuras cuticulares del adulto (Figura 3). Durante el desarrollo de los discos imaginales, la expresión diferencial de genes mediada por la actividad de diferentes rutas de señalización dirige la formación de los patrones de diferenciación característicos de las estructuras adultas correspondientes.



**Figura 2. Discos imaginales de *Drosophila melanogaster*.** Representación esquemática de los discos imaginales y de las regiones correspondientes en el individuo adulto. Los discos imaginales aparecen en el interior de la larva en la parte central de la figura. Sus nombres se indican mediante un código de números en la columna de la derecha. Las estructuras adultas a las que dará lugar cada disco imaginal se muestran conectadas a los discos por líneas, encontrando en la parte superior de la figura la cabeza, torax-ala y halterio, y en la parte inferior de la figura las estructuras mandibulares, los tres pares de patas y la genitalia. Modificado de "Imaginal Dics" de Lewis I. Held, Jr.



**Figura 3. Disco imaginal de ala y ala adulta.** (A) Sección de microscopía confocal de la región de ala del disco imaginal de ala de una larva III en el que se marca la F-actina con Phalloidina (gris). Abajo y a la derecha del disco aparecen las secciones transversal y longitudinal del disco, respectivamente, y una representación esquemática de las mismas indicando la membrana peripodial y el epitelio columnar. (B) Ala adulta de *Drosophila melanogaster* indicando la posición de las venas longitudinales (L2-L5). Modificado de Molnar C. y de Celis JF. (2006).

Los discos imaginales de ala y halterio se subdividen en compartimentos anterior (A) y posterior (P) y dorsal (D) y ventral (V) a lo largo de su desarrollo (Garcia-Bellido et al., 1973; Crick and Lawrence, 1975). Los compartimentos posterior y dorsal corresponden a dominios de expresión de genes específicos como *engrailed* (*en*) y *apterous* (*ap*), respectivamente (Figura 4) (Cohen et al., 1992; Kornberg et al., 1985). En los bordes entre compartimentos se expresan proteínas que actúan como ligandos de distintas rutas de señalización, a los que se han denominado morfógenos, que activan sus señalizaciones y regulan la expresión de genes diana en distintos dominios espaciales, organizando el crecimiento y la formación de patrón de cada disco (Blair, 1995; Hidalgo, 1998; Irvine and Vogt, 1997; Lawrence and Struhl, 1996; Struhl and Basler, 1993). En el desarrollo de todos los discos imaginales participan fundamentalmente cinco rutas de señalización: Hedgehog (Hh), Decapentaplegic (Dpp), Wingless (Wg), EGFR y Notch (N) (Blair, 1995; Irvine and Vogt, 1997; Lawrence and Struhl, 1996). Estas rutas están altamente conservadas en otros organismos (Bray, 2006; Chien et al., 2009; Massague and Wotton, 2000; Ruiz-Gomez et al., 2007; Shilo, 2003).

#### 4. Formación de patrón en el disco imaginal de ala

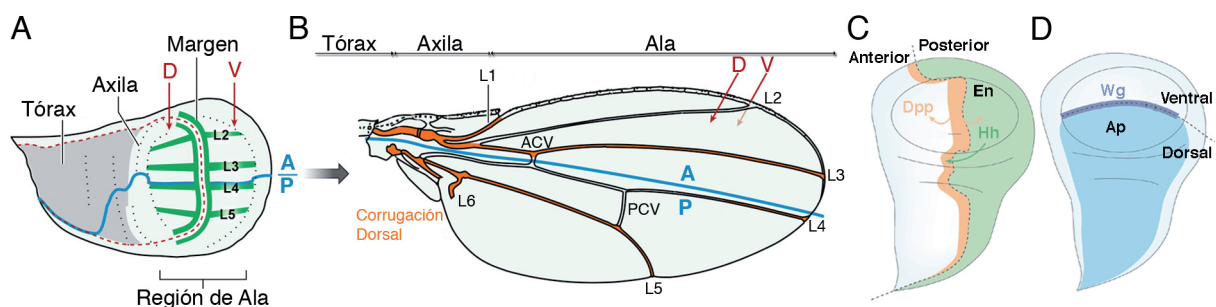
El ala de *Drosophila* se forma a partir del disco imaginal mesotorácico dorsal. Este disco comienza su desarrollo a partir de un grupo de 20 células embrionarias, que proliferan durante el desarrollo larvario formando un disco maduro compuesto por aproximadamente 50.000 células al final del tercer estadio larvario. Tras los procesos que ocurren durante la metamorfosis las células del disco de ala forman el ala adulta y parte del tórax (Figura 4A-B) (Zecca and Struhl, 2002). El primer proceso de especificación genética que ocurre en el primordio

embrionario es la aparición de los compartimentos anterior y posterior, debido a la expresión del factor de transcripción *Engrailed* únicamente en el compartimento posterior (Figura 4C) (Kornberg et al., 1985). Esta subdivisión se mantiene a lo largo del desarrollo por mecanismos epigenéticos y por la activación de la ruta de señalización del ligando Hedgehog en células anteriores (Tabata and Kornberg, 1994). Este hecho ocurre de igual manera en la formación de las extremidades de vertebrados donde se requiere la expresión del gen *Sonic Hedgehog* (*Shh*) en la ZPA (Zona de Actividad Polarizante) para el establecimiento de la polaridad anterior-posterior (Figura 5) (Duboc and Logan, 2009; Abarca-Buis et al., 2006; Towers and Tickle, 2009). Durante el segundo estadio larvario ocurren otras subdivisiones que generan en primer lugar territorios con distinta identidad histotípica como son la membrana peripodial y el epitelio propio (Nusinow et al., 2008). También en este estadio ocurre la especificación de los territorios proximales y distales del epitelio, debido a la expresión de los genes *wingless* (*wg*) en el territorio distal (Williams et al., 1993) y *vein* (*vn*) en el territorio proximal (Baonza et al., 2000; Simcox et al., 1996; Wang et al., 2000). Estos genes codifican para los ligandos que activan las vías de señalización Wg y EGFR respectivamente. Finalmente, y también en el segundo estadio larvario, la regulación por parte de las rutas EGFR y Wg de la expresión de diferentes factores de transcripción conduce a la subdivisión del epitelio en los compartimentos dorsal y ventral, debido a la expresión diferencial del gen *apterous* en las células del compartimento dorsal (Figura 4D) (Diaz-Benjumea and Cohen, 1993). De igual modo, en vertebrados, el establecimiento de la región dorsal también viene determinado por la expresión diferencial de distintos genes como *Wnt7*, cuya regulación ocurre en parte por la ruta Wnt (Wingless). También, durante el crecimiento próximo-distal, en el centro de señalización AER (Cresta ectodérmica apical) se puede observar la expresión del *Fgf8*, cuya expresión está regulada por la ruta de señalización FGF (Factor de Crecimiento de Fibroblastos) (Figura 5) (Duboc and Logan, 2009; Abarca-Buis et al., 2006; Towers and Tickle, 2009).

En los bordes entre los distintos compartimentos se produce la activación de diferentes rutas de señalización que dirigen la generación de patrones de expresión génica centrados en estos bordes entre compartimentos. Así, en el borde del compartimento A/P del disco imaginal de ala la actividad de la ruta de señalización Hh induce la expresión en células anteriores del gen *decapentaplegic* (*dpp*) (Figura 4C) (Basler and Struhl, 1994; Zecca et al., 1995), y del factor de transcripción Collier/Knot en la región central del ala. Los efectos combinados de las rutas Hh y Dpp conducen al establecimiento de dominios de expresión génica relacionados con la formación del patrón de diferenciación en el eje anterior-posterior (de Celis et al., 1996a; Mohler et al., 2000; Nellen et al., 1996; Vervoort et al., 1999). En el borde del compartimento D/V se produce la activación de la ruta de señalización Notch, que se requiere para la expresión del gen *wg* (Figura 4D), y para la formación del primordio del ala primero y más tarde para la for-

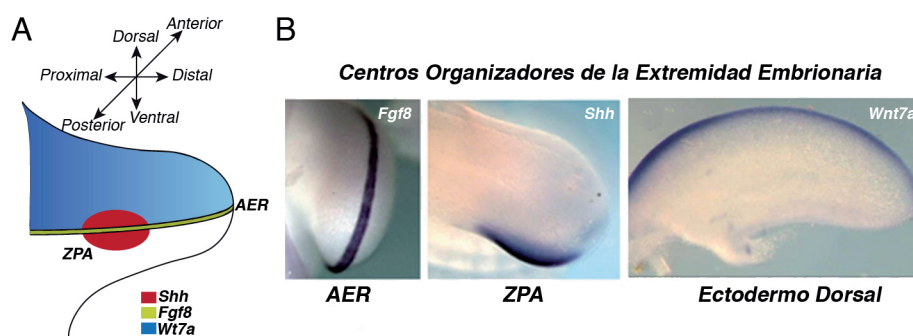
mación del margen del ala (de Celis et al., 1996b; Diaz-Benjumea and Cohen, 1995; Kim et al., 1995; Micchelli et al., 1997; Rulifson and Blair, 1995; Williams et al., 1994; Zecca et al., 1996).

La formación del patrón de venas está íntimamente ligada al desarrollo del disco imaginal de ala (de Celis, 2003) y en particular a la subdivisión de éste en compartimentos. Las venas son estructuras cuticulares que confieren rigidez estructural al ala y están formadas por células con una menor superficie apical y una mayor pigmentación que las células de intervena (Garcia-Bellido and de Celis, 1992). Las alas de *Drosophila* tienen cuatro venas longitudinales completas (L2-L5) y dos venas transversales (a-cv y p-cv), que conectan las venas longitudinales L3-L4 y L4-L5 respectivamente. En las regiones más anterior y posterior del ala aparecen dos venas longitudinales incompletas (L1 y L6) (Figura 4B). Las rutas de señalización Hh y Dpp juegan un papel central en el patrón del ala a lo largo del eje antero-posterior y en el posicionamiento de las regiones de provena (Basler and Struhl, 1994; Lawrence and Struhl, 1996). En concreto la ruta de señalización Hh regula el desarrollo de las provenas L3 y L4 y de la región de intervena comprendida entre éstas (Mohler et al., 2000; Vervoort et al., 1999), regulando la expresión de sus genes diana de manera dependiente de los niveles de actividad de la vía. La ruta Hh también contribuye, de forma indirecta, a la determinación del patrón y crecimiento de las regiones laterales del ala, a través de la regulación de la expresión de *dpp*.



**Figura 4. Desarrollo del ala de *Drosophila melanogaster*.** (A) Esquema del disco imaginal de ala mostrando los bordes de compartimento anterior-posterior (A/P; línea azul) y dorsal-ventral (D/V; línea roja). En verde aparecen marcadas las regiones que darán lugar al margen del ala y las venas L2, L3, L4 y L5. Se indica mediante una línea discontinua la región que dará lugar al tórax, axila y ala. (B) Representación esquemática del ala adulta mostrando las venas longitudinales (L1-L6) y las venas transversales (ACV y PCV). Las regiones posterior (P) y anterior (A) aparecen separadas por una línea azul, y mediante flechas rojas se indica las superficies dorsal (D) y ventral (V) del ala. (C-D) Representación esquemática del disco imaginal de ala indicando la posición de los compartimentos A y P (azul y verde, respectivamente en C) y de los compartimentos dorsal y ventral (azul oscuro y claro, respectivamente en D). Las células posteriores expresan el gen *engrailed* (En) y el ligando Hedgehog (Hh), que induce la expresión del gen *decapentaplegic* (Dpp; naranja en C) en las células anteriores, y las células dorsales expresan el gen *apterous* (Ap) (azul en D). En las células del borde D/V se activa la ruta Notch, que a su vez activará la expresión del gen *wingless* (Wg; azul oscuro en D). Modificado de Blair SS. (2007) y Kiecker C. y Lumsden A. (2005).



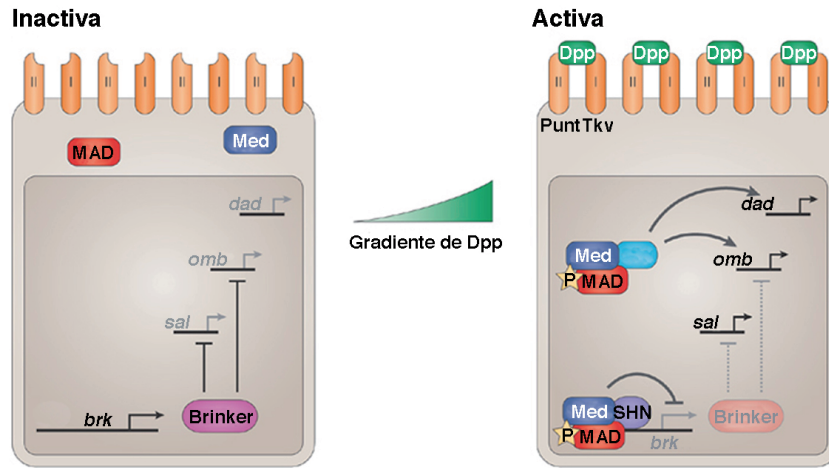


**Figura 5. Desarrollo de la extremidad embrionaria de vertebrados.** (A) Representación esquemática del primordio de la extremidad de vertebrados. Se indica mediante flechas la orientación de los diferentes ejes. La expresión del gen *Fgf8* (verde) en la Cresta ectodérmica apical (AER), está implicado en la formación del patrón próximo-distal. La expresión del gen *Wnt7* (azul) en el ectodermo dorsal, está implicada en la formación del patrón dorsal-ventral. La expresión del gen *Sonic hedgehog* (*Shh*) (rojo) en la Zona de Actividad Polarizante (ZPA), está involucrada en la formación del patrón anterior-posterior. (B) Hibridación *in situ* de los genes *Fgf8*, *Shh* y *Wnt7a* en la extremidad embrionaria de vertebrados. Modificado de Abarca-Buis, R.F. et al., (2006).

## 5. La ruta de señalización Decapentaplegic (Dpp)

La ruta de señalización Dpp está muy conservada en distintos organismos. En el disco imaginal de ala regula su crecimiento y la formación del patrón de venas en el eje antero-posterior (Affolter and Basler, 2007). La activación de esta ruta en el disco imaginal de ala ocurre en su región central, donde el ligando Dpp se expresa en el borde A/P y activa sus receptores en la región central del disco (de Celis et al., 1996a; Entchev et al., 2000; Teleman and Cohen, 2000). Los receptores de Dpp son proteínas de membrana con actividad quinasa en serinas y treoninas, y están codificados por los genes *thickveins* (*tkv*) y *punt* (*pnt*). Los receptores activados fosforilan a la proteína Mad, que se une a Medea (Med), formando el complejo Mad-Med que se transloca al núcleo donde regula la transcripción de genes diana (Figura 6). Las proteínas Mad y Med son las homólogas en *Drosophila* de las proteínas de vertebrados Smad3-5 y Smad4, respectivamente (Massague and Wotton, 2000). En colaboración con el represor Schnurri (*shn*), el complejo Mad-Med reprime la expresión del represor transcripcional Brinker (*brk*) en el centro del ala (Muller et al., 2003). Brk, que sólo se expresará en las regiones periféricas del disco, reprime la expresión de genes diana de la ruta Dpp en estos territorios. Los genes diana de la ruta mejor caracterizados son el gen *omb*, los genes del complejo *spalt* y el gen *dad* (de Celis et al., 1999; Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996). El gen *dad* constituye un elemento de regulación negativa de la ruta, ya que previene la fosforilación de Mad y por tanto la formación de complejos activos Mad-Med (Figura 6). Los genes *omb* y *spalt* se expresan en dominios centrales de distinta anchura, y ambos contribuyen a la formación del patrón de las venas L2 y L5 (Cook et al., 2004; de Celis and Barrio, 2000; del Alamo Rodriguez et al., 2004; Sturtevant et al., 1997).

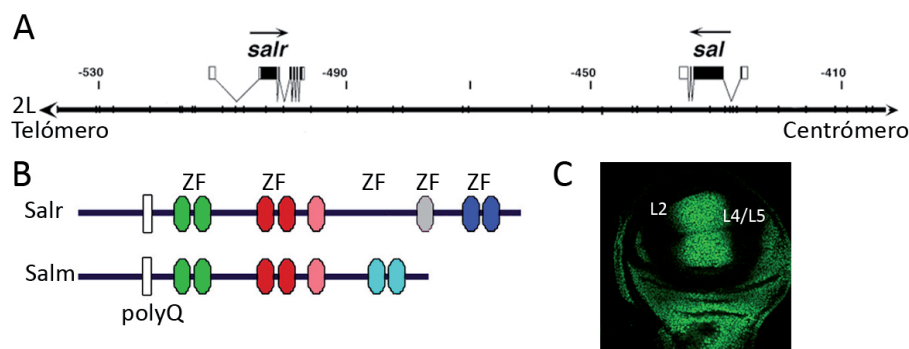




**Figura 6. Ruta de señalización Decapentaplegic (Dpp).** Esquema de la ruta de señalización Dpp, donde se muestra el estado de la ruta y sus dianas en ausencia (panel de la izquierda) o presencia (panel de la derecha) del ligando Dpp. Se indican las relaciones jerárquicas entre los miembros de cada ruta mediante flechas (activación) y barras (represión). Modificado de Affolter M. y Basler K. (2007).

## 6. El complejo génico *spalt*

El complejo génico *spalt* (*sal*) está formado por dos genes, *spalt major* (*salm*) y *spalt related* (*salr*). Están situados en el brazo cromosómico 2L y se encuentran separados por 50Kb de ADN no codificante que contiene secuencias reguladoras (Figura 7A). Ambos genes codifican para factores de transcripción que se caracterizan por tener varios pares de dedos de zinc de la clase C2H2 y un dominio rico en glutaminas (Figura 7B) (de Celis and Barrio, 2000; de Celis and Barrio, 2009; de Celis et al., 1996a; Kuhnlein et al., 1994; Barrio et al., 1996). Las proteínas Sal están conservadas a lo largo de la evolución, estando presentes desde *C. elegans*, donde encontramos un único gen, hasta vertebrados, donde encontramos cuatro genes (*SALL1-4*), y desempeñan un papel importante en la especificación de destinos celulares, formación de patrones y organogénesis (de Celis and Barrio, 2009; Sweetman and Munsterberg, 2006).



**Figura 7. Complejo génico Spalt.** (A) Representación esquemática de los genes *spalt major* (*sal*) y *spalt related* (*salr*) en el brazo cromosómico 2L. (B) Esquema de los dominios conservados presentes en las proteínas Sal. Los círculos de colores representan dedos de zinc (ZF) de la clase C2H2, el rectángulo blanco representa la región polyQ. (C) Expresión de la proteína Sal (verde) en un disco imaginal de ala de tercer estadio larvario. Modificado de de Celis JF. y Barrio, R. (2009).

En *Drosophila*, la activación de la expresión de estos genes depende de distintas rutas de señalización según el tejido del que se trate, existiendo distintos enhancers responsables de su activación. Así, en el disco imaginal de ala la expresión de estos genes está regulada directamente por la ruta de señalización Dpp (Barrio and de Celis, 2004) y está localizada en la región comprendida entre la vena L2 y la intervena L4/L5 (Figura 7C). En el caso de *salm*, la expresión está dirigida por un enhancer de 453 pares de bases que posee sitios de unión para las proteínas Mad/Med y Brk (Barrio and de Celis, 2004). El enhancer de *salr* no ha sido aún identificado. Los genes *sal* se requieren para el crecimiento y formación del patrón del ala (de Celis et al., 1996a), dado que su falta de función provoca defectos en la formación del patrón de venas y en el tamaño de ésta.

La función de los genes *Sal* se requiere también para la especificación de distintos tipos celulares, como los fotorreceptores R3, R4, R7 y R8 en el disco de ojo-antena (Mollereau et al., 2001; Domingos et al., 2004a; Domingos et al., 2004b), los precursores de los órganos sensoriales del tórax en el disco de ala (de Celis et al., 1999), los oenocitos en el embrión (Gould et al., 2001) y los músculos fibrilares del vuelo (Schonbauer et al., 2011). También participan en la formación del sistema traqueal (Kuhnlein and Schuh, 1996), desarrollo neural (Cantera et al., 2002) y en la formación del órgano de Johnston (Dong et al., 2003).

En vertebrados las proteínas *Sal* (*SALL1-4*) también están involucradas en diversos procesos durante el desarrollo, como la organogénesis de los sistemas auditivo y renal (Nishinakamura et al., 2001) y el mantenimiento de las células madre embrionarias (Wong et al., 2008; Wu et al., 2006). Durante el desarrollo de las extremidades en vertebrados se expresan varias proteínas *Sall*, por ejemplo, en *Xenopus* observamos la expresión de *Xsall4* en las extremidades anteriores y posteriores (Neff et al., 2005), mientras que en ratón se observa la expresión de *sall1* (Buck et al., 2001). Mutaciones en los genes *SALL1* y *SALL4* son la causa de varios síndromes hereditarios humanos como el síndrome de Okihiro (*SALL4*), que cursa con sordera y malformaciones renales (Al-Baradie et al., 2002; Kohlhase et al., 2002), o el síndrome de Townes-Brocks (*SALL1*), que se manifiesta con múltiples malformaciones anorectales y malformaciones en las extremidades y oído, así como anomalías renales que conducen a una función renal deteriorada y fallo renal (Kohlhase et al., 1998; Surka et al., 2001). Pocos efectos asociados a los genes *Sall2* y *Sall3* han sido descritos. En el caso de *Sall2* hay datos que lo relacionan con la aparición de distintos tipos de cánceres, como por ejemplo el carcinoma de ovario (Kohlhase et al., 1996), y *Sall3* está asociada con el síndrome de supresión de 18q (Kohlhase et al., 1999).

A pesar de que se han identificado muchos procesos de desarrollo en los que las proteínas Spalt participan, se conoce poco sobre los mecanismos moleculares que rigen su función, y aún menos sobre los genes a través de los cuales desempeñan estas funciones. Se ha descrito que los genes *sal* pueden actuar, según el contexto, tanto como activadores y como represores de la transcripción (de Celis and Barrio, 2009; Li et al., 2004; Sanchez et al., 2011; Wu et al., 2006; Yamashita et al., 2007; Yang et al., 2007; Zhang et al., 2006). Así, durante el desarrollo del ala de *Drosophila* los genes *sal* son necesarios para la activación y represión del gen *kni-C* (de Celis and Barrio, 2000) y para la represión del gen *iro-C*. Se desconoce el mecanismo por el cual las proteínas Sal pueden ejercer a la vez como activadores y represores de transcripción. En *Drosophila* se ha demostrado que la proteína Salr interacciona directamente con secuencias de ADN ricas en AT (Barrio et al., 1996; Shea et al., 1990). También se ha descrito que las proteínas Sal son modificadas por SUMO (“small ubiquitin-related modifier”), lo cual influye sobre su localización subnuclear y actividad transcripcional (Sanchez et al., 2011; Sanchez et al., 2010). Sin embargo, se conoce poco sobre las regiones del genoma a las que se unen estas proteínas, y por tanto no se conoce qué genes actúan como sus dianas transcripcionales mediante sus funciones durante el desarrollo.

En este trabajo definimos las funciones de las proteínas Sal durante el desarrollo del ala, con el objetivo de relacionar estos requerimientos con las funciones descritas para la ruta de señalización Dpp. Dada la importancia de estas funciones, y el que los genes *sal* son factores de transcripción que mediarán sus funciones a través de la activación o represión de genes diana, en este trabajo también abordamos la identificación de dichos genes.





## Objetivos



1. Identificar las funciones de las proteínas Spalt durante el desarrollo del ala de *Drosophila melanogaster*.
2. Establecer la relación funcional entre las proteínas Spalt y la vía de señalización Dpp.
3. Identificar genes regulados transcripcionalmente por las proteínas Spalt en el disco imaginal de ala de *Drosophila melanogaster*.





## Materiales y métodos



## 1. Cultivo de *Drosophila melanogaster*

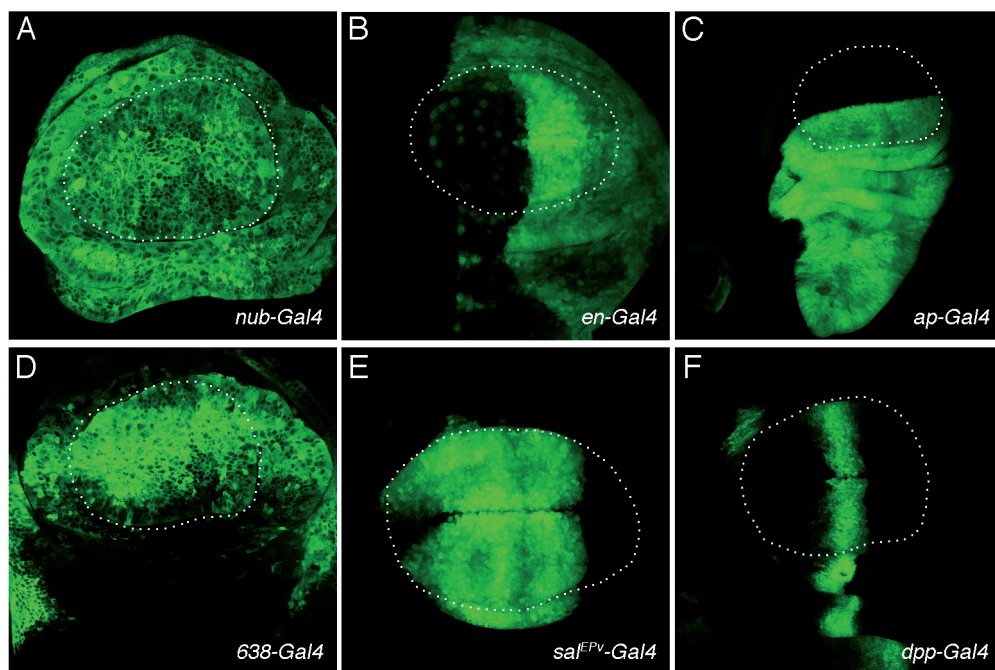
El mantenimiento de todas las estirpes de *Drosophila* y la ejecución de los experimentos fue llevado a cabo en cámaras de temperatura reguladas a 17°C, 25°C y 29°C, según el caso, en un medio de cultivo estándar preparado a partir de harina, glucosa, agar, levadura y ácido propiónico.

## 2. Estirpes de *Drosophila melanogaster*

El sistema *GAL4/UAS* (Brand and Perrimon, 1993) permite dirigir la expresión de genes hacia dominios espaciales determinados. Para los análisis de sobre-expresión se emplearon las siguientes líneas *Gal4*: *nub-Gal4*, *en-Gal4*, *ap-Gal4* (Calleja et al., 1996), *dpp-Gal4* (Staehling-Hampton and Hoffmann, 1994), *638-Gal4* (Barrio and de Celis, 2004) y *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* (Cruz et al., 2009) (Figura 8); la línea *tub-Gal80<sup>TS</sup>* y las líneas *UAS*: *UAS-GFP* (Ito et al., 1997), *UAS-salm* (de Celis et al., 1996a), *UAS-brk* (Jazwinska et al., 1999), *UAS-tnfr<sup>QD</sup>* (Nellen et al., 1996), *UAS-dppGFP* (Teleman and Cohen, 2000), *UAS-puc* (Martin-Blanco et al., 1998), *UAS-dad*, *UAS-stg* y *UAS-dicer* (Dietzl et al., 2007). La expresión de la línea *nub-Gal4* está restringida a todo la región de ala del disco imaginal de ala. La expresión de la línea *dpp-Gal4* está restringida al borde anterior-posterior del disco imaginal de ala. La expresión de la línea *en-Gal4* está restringida al compartimento posterior de todos los discos imaginales y la expresión de la línea *ap-Gal4* a la

región dorsal de los discos de ala y halterio. La expresión de la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* está restringida a la región central del disco imaginal de ala, región que corresponderá a la zona comprendida entre la vena L2 y la intervena L4-L5 del ala adulta (Figura 8). También se utilizaron las líneas UAS-ARN interferente *UAS-salm-i* (ID 3029 VDRC), *UAS-salr-i* (ID 28386 VDRC), *UAS-Mad-i* (ID 12399-R2 NIG-FLY), *UAS-Med-i* (ID 19688 VDRC), *UAS-CycA-i* (ID 32421 VDRC) y *UAS-omb-i* (ID 100598 VDRC), cuya referencia se puede encontrar en las páginas web <http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/index.jsp> y <http://stockcenter.vdrc.at/control/main>. Se utilizaron los alelos de falta de función *Df(2L)32FP5* (Barrio et al., 1999) y *tkv<sup>a12</sup>* (Burke and Basler, 1996). Además, se han utilizado las siguientes líneas reporteras: *puc<sup>E69</sup>-lacZ* (Martin-Blanco et al., 1998), *dve<sup>K06515</sup>-lacZ* (BDGP) y *l(2)06496<sup>06496</sup>-lacZ* (BDGP).

Para la generación de clones de recombinación mitótica se han utilizado las estirpes *hsFLP1.22; FRT40A ubi-GFP/CyO*, *hsFLP1.22; FRT40A P[armlacZ]/CyO*, *f<sup>36a</sup> hsFLP1.22; ck P[f<sup>r</sup>]30 FRT40A/CyO*, *f<sup>36a</sup>; M(2)z P[f<sup>r</sup>]30B FRT40A/CyO*, *w hsFLP1.22 P[tub-Gal4] UAS-GFP; P[tub-Gal80<sup>TS</sup>] FRT40A/CyO* y *tub<FRT-GFP-FRT>Gal4 UAS-FLP/TM6b*.



**Figura 8. Líneas Gal4.** Patrones de expresión de las líneas Gal4 utilizadas en este trabajo. Se muestra la expresión de GFP (verde) en discos de ala de larva III de combinaciones entre las líneas Gal4 indicadas y la línea UAS-GFP. La línea punteada indica la región presuntiva de ala.

Para el análisis de microarrays se utilizaron las estirpes: *638-Gal4* (Barrio and de Celis, 2004) (Figura 8D), *756-Gal4* (de Celis et al., 1996a), *UAS-salm*, *FRT40 Df(2L)32FP5/CyO*, *UAS-FLP* (Duffy et al., 1998) y *w hsFLP; P[Ubi-GFP] M(2)z FRT40A/CyO*. También se utilizaron líneas

UAS-ARN interferente cuya referencia se puede encontrar en la página web <http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly/index.jsp> (Tabla Suplementaria 1), <http://stockcenter.vdrc.at/control/main> (Tabla Suplementaria 2) y <http://flystocks.bio.indiana.edu/> (Tabla Suplementaria 3). Las líneas mencionadas para las que no se facilita la fuente se pueden encontrar a través de FlyBase: <http://flybase.org/>.

### 3. Análisis clonal

#### 3.1. Análisis clonal utilizando recombinación mitótica inducida por FLP

Para generar clones tanto de ganancia de función como de falta de función se sometió a las larvas a un choque de calor a 37°C durante 1 hora a lo largo del segundo estadio larvario (48-72 horas tras la puesta del embrión). Los discos imaginales se prepararon a partir de larvas en el tercer estadio, y se tiñeron y montaron como se describe en el apartado de inmunohistoquímica.

Los genotipos analizados en el disco imaginal fueron los siguientes:

- *hsFLP1.22/+; Df(2L)32FP5 FRT40/P[armlacZ] FRT40*
- *hsFLP1.22/+; tkv<sup>a12</sup> FRT40/P[armlacZ] FRT40*
- *y w hsFLP1.22 P[tub-Gal4] UAS-GFP/+; P[tub-Gal80] FRT40A/P[ubi-GFP] FRT40; UAS-salm/+*
- *y w hsFLP1.22 P[tub-Gal4] UASGFP/+; P[tub-Gal80] FRT40A/tkv<sup>a12</sup> FRT40; UAS-salm/+*
- *y w hsFLP1.22 P[tub-Gal4] UASGFP/+; P[tub-Gal80] FRT40A/tkv<sup>a12</sup> FRT40; UAS-salm/+*
- *y w hsFLP1.22 P[tub-Gal4] UASGFP/+; P[tub-Gal80] FRT40A/P[ubi-GFP] FRT40; UAS-tkv<sup>Q253D</sup>/+*

En los dos primeros casos los clones se distinguieron por la ausencia de expresión del marcador lacZ, en el resto de casos los clones se distinguieron por la expresión de la proteína GFP.

Los genotipos analizados en el adulto fueron:

- *f<sup>36a</sup> hsFLP1.22; Df(2L)32FP5 FRT40/ck P[f<sup>\*</sup>]30F FRT40*

En este caso los clones analizados en el ala adulta se identificaban por la presencia del

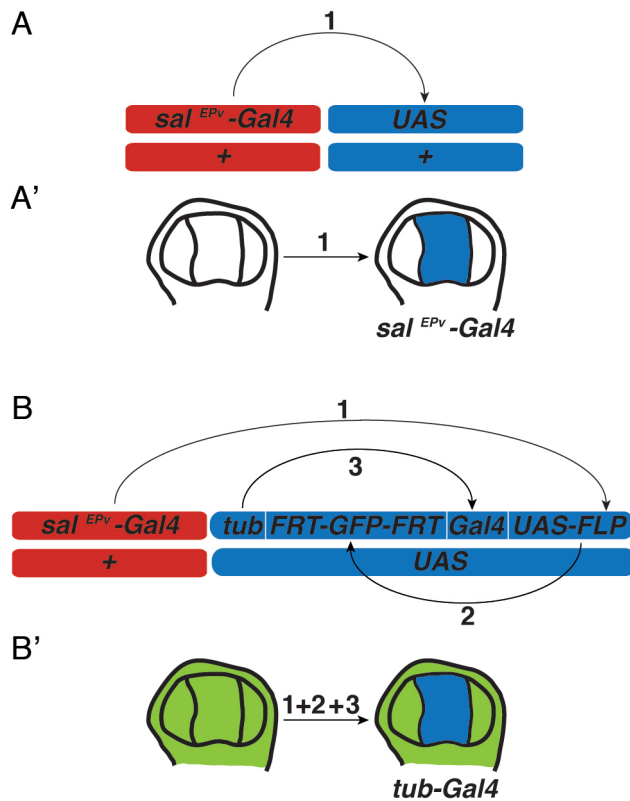
marcador celular *forked* (*f*) y los clones gemelos por el marcador *crinkled* (*ck*).

### 3.2. Inducción de tejidos clonales con el sistema *Gal4/UAS-FLP*

Se utilizó la mutación *M(2)z* y la expresión de FLP dirigida por Gal4 para generar alas homocigóticas en individuos del siguiente genotipo:

- *638-Gal4/+; Df(2L)32FP5 FRT40/M(2)z FRT40; UAS-FLP/+*

También se generaron clones mutantes en discos imaginales de tercer estadio utilizando la línea *Gal4 sal<sup>EPV</sup>-Gal4* (Figura 8E) para sobre-expresar las líneas *UAS salm*, *UAS-brk* y *UAS-Mad-i*, según se explica en el esquema de la Figura 9, en los siguientes genotipos:



**Figura 9. Sistema UAS/Gal4/UAS-FLP.** (A) La inserción *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* (rojo), permite la expresión de Gal4 en la región central del ala, donde activa la expresión de genes adyacentes a la secuencia promotora *UAS* (azul). (A') Expresión del gen adyacente a las secuencias *UAS* (azul) en la región central del ala. (B) Mediante el sistema *Gal4/UAS* la proteína Gal4 (rojo) activa la expresión del gen FLP (*UAS-FLP*) en la región central del ala (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4*) (1). La proteína FLP se une a las secuencias FRT haciendo que recombinen y pierdan la expresión de la proteína GFP (verde) en dicha región (2). En la región central del ala ahora la expresión de la secuencia promotora *UAS* (azul) será dirigida por la línea *tub-Gal4* (3). (B') Esquema de discos imaginales con el genotipo indicado en B.

- *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/UAS-salm*.
- *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/UAS-salm UAS-Mad-i*.
- *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/UAS-salm UAS-brk*.
- *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-GFP; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/UAS-Mad-i*.
- *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-GFP; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/UAS-brk*.

### 3.3. Inducción de tejidos clonales mediante rayos X

La generación de clones de recombinación mitótica fue inducida mediante rayos X (100r) según está descrito en (de Celis et al., 1996a) en larvas de genotipo:

-  $f^{36a}; Df(2L)32FP5 FRT40/M(2)z P[f^+ ]30B FRT40$

Las células homocigóticas mutantes fueron identificadas por el marcador celular *forked* (*f*).

## 4. Tinciones inmunohistoquímicas

Para las tinciones inmunohistoquímicas se fijaron cabezas de larva de tercer estadio durante 20 minutos en Paraformaldehído 4%. Posteriormente se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS, 3 lavados de 15 minutos con PBS-0,3% TritonX100 (PBT) y un lavado con PBT-0,3%-BSA-NaCl (250mM) durante 30 minutos. Después se incubaron con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Tras retirar el anticuerpo primario y realizar varios lavados con PBT-0,3%-BSA-NaCl (250mM), se incubaron las cabezas con anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se lavaron las cabezas con PBT-0,3%-BSA-NaCl (250mM) y se prepararon para su procesamiento.

Los anticuerpos primarios utilizados se diluyeron en PBT-0,3%-BSA-NaCl (250mM), y fueron los siguientes: De rata: anti-Salm (1:50) (de Celis and Barrio, 2000); de conejo: anti-Caspasa3 activada (1:50) (Cas3, Cell Signalling Technology), anti-Histona3 Fosforilada (1:1000) (PH3, Cell Signalling Technology) y anti-Nab (1:50) (Terriente Felix et al., 2007); de ratón: anti-βGalactosidasa (1:1000) (Promega); y TOPRO (Invitrogen) y Faloidina-TRITC (Phall) (Sigma); cobja anti-Sens (1:1000) (Nolo et al., 2000). Los anticuerpos primarios utilizados del Hibridoma bank de la Universidad de Iowa fueron anti-Wg, anti-FasIII, anti-Dlg y anti-Dl. Los anticuerpos secundarios utilizados proceden de Jackson Immunological Laboratories (1:200).

## 5. Análisis del ciclo celular por citometría de flujo

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo mediante la técnica de FACS ("Fluorescence Activated Cell Sorting"). Para ello se diseccionaron 25-30 larvas de tercer estadio larvario en PBS a 4°C. Se recogieron los discos imaginales de ala en un eppendorf con PBS a 4°C. Los discos se acumularon en el fondo del eppendorf por centrifugación y se eliminó el PBS. Posteriormente se añadieron 300 µl de tripsina (Trypsin-EDTA Sigma T4299) + 0,5 µl de Hoescht



(Hoescht 33342, Trihydrochloride Trihydrate H3570, Molecular Probes™) y se incubó a 28°C en agitación suave durante 40 minutos. Durante la incubación cada 10 minutos se pipetea suavemente los discos para disgregar las células. Para parar la reacción de tripsina sobre los discos se añadieron 200 µl de PBS + FBS (Fetal Bovine Serum Sigma™ 9665) 1% a 4°C, y la mezcla se agitó suavemente, se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 5 minutos y se suspendió en 300 µl de PBS + FBS 1% a 4°C. La toma de muestras se llevó a cabo en un equipo FACS Vantage 2 (Becton Dickinson™). Se realizaron 5 experimentos independientes por genotipo, obteniendo los perfiles de ciclo celular en cada experimento con poblaciones de más de 10.000 células. La temperatura de ejecución de todos los cruces para cada experimento fue de 25°C. Las edades de disección de las larvas fueron 96-120 horas AEL. Los perfiles de ciclo celular y los análisis de las poblaciones celulares se realizaron con el programa informático FloJow 7.5. Se cuantificó la proporción de células en G1/G2 en la región central del disco imaginal de ala y en el resto del disco en cada genotipo. Los genotipos analizados fueron:

- *UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*
- *UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+*

## 6. Microarrays

La extracción de ARN, preparación de sondas e hibridación en los arrays de Affymetrix, INDAC y Operon se realizó por el Dr Jesús de Celis en el servicio de genómica del CBMSO (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa).

El procesamiento de los datos obtenidos en los microarrays fue realizado con el programa informático almaZen, la información sobre dicho programa se puede encontrar en la página web <http://www.jnetdirectbiosciences.com/almazen.htm>. Se realizó una anotación GO (Gene Ontology) utilizando las herramientas informáticas provistas por “FlyMine” (<http://www.flymine.org/>).

## 7. Generación de sondas de ARN

### 7.1. Generación de sondas de ARN a partir de ADNc

Los ADN complementarios (ADNc) a partir de los cuales se generaron sondas para hibridación *in situ* se obtuvieron de las colecciones de *Expression Sequence Tags* (EST) de *Berkeley Drosophila Genome Project* (Tabla Suplementaria 4). Los EST se crecieron a 37°C en placas de LB-agar con cloranfenicol o ampicilina, según la resistencia del plásmido (pOT2 y pOTB7 o

pFLC1), durante 14-16 horas. Las colonias individuales se crecieron en 5ml de cultivo LB líquido con el antibiótico correspondiente durante 14-16 horas a 37° C en agitación, y el plásmido se purificó con el Sistema de Purificación de ADN de Promega (Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System). La identidad de cada ADNc se confirmó mediante un análisis de electroforesis en gel de agarosa (1% en TAE) de los tamaños producidos por la digestión del vector que porta el ADNc con las enzimas de restricción adecuadas para cada caso (2 horas a 37° C). Para ello, previamente se hizo un estudio del mapa de restricción de cada ADNc con el programa informático EnzymeX3.

Para preparar las sondas se linearizaron 2µg de cada uno de los plásmidos con el ADNc mediante digestión con la enzima de restricción cuya diana se encuentra o en el extremo 3' del ADNc (sonda sentido para controles) o en el extremo 5' (sonda anti-sentido). Para el marcaje de la sonda se llevó a cabo una reacción de transcripción a partir del plásmido linearizado (1 µg) con la ARN polimerasa correspondiente para cada caso (SP6, T7 o T3) en presencia del análogo de base digoxigenina. Tras 2 horas de transcripción a 37° C del ADN lineal, la reacción se incubó con ADNasal durante 15 minutos a 37° C, se precipitó con EDTA 0,5M, LiCl 5M y Etanol Absoluto, y el ARN marcado se disolvió en 50 µl de ddH<sub>2</sub>O.

## 7.2. Generación de sondas de ARN a partir de producto de PCR

Se prepararon sondas de ARN mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) a partir de ADN genómico. Para ello se eligieron regiones codificantes de entre 500 y 1000 pares de bases de cada gen y se amplificaron usando sus correspondientes oligonucleótidos, los cuales se diseñaron con las secuencias de las ARN polimerasa T7 TAATACGACTCACTATAGGG y T3 ATTAACCCTCACTAAAGGGA en sus extremos. Los productos de PCR se purificaron por el sistema de purificación de productos de PCR de Quiagen y se procedió a la síntesis de las sondas de ARN mediante una reacción de transcripción con las ARN polimerasa T7 y T3. Tras 2 horas de transcripción a 37°C, las reacciones se incubaron con ADNasal durante 15 minutos a 37°C, se precipitaron con EDTA 0,5M, LiCl 5M y Etanol Absoluto, y el ARN marcado se disolvió en 50 µl de ddH<sub>2</sub>O. Los genes para los cuales se realizaron sondas de ARN mediante PCR y los oligonucleótidos correspondientes se muestran en la Tabla Suplementaria 5.

En el caso de los genes *His4:CG31611* y *Spn43Aa* los oligonucleótidos utilizados para la realización de la PCR no se diseñaron con las secuencias de las ARN polimerasas T7 y T3, sino que la región amplificada fue clonada en el vector pBluescript II SK+ (Stratagene). En dicho vector se encuentran las secuencias de las ARN polimerasa T7 y SP6. Los oligonucleótidos utilizados para ello fueron, en el caso del gen *His4:CG31611* CTGAATGGTGGTCCTGAA y TCGGTGCTCTTTTGGTAG,

y para el gen *Spn43Aa* GTTTTACTGATTCCTCTGG y TCTCCGCATTATTATTGAT. La preparación de las sondas se llevó a cabo como se ha indicado anteriormente para los ADNc. La sonda de ARN del gen *stg* fue cedida por el Dr Antonio Baonza.

## 8. Hibridaciones *in situ*

Todas las hibridaciones *in situ* realizadas en los discos imaginales se llevaron a cabo con sondas de ARN marcadas con digoxigenina. Para la hibridación *in situ*, se fijaron cabezas de larva de tercer estadio durante 30 minutos en formaldehído 4% en PBS. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS-0,1% Tween20, se fijaron de nuevo durante 20 minutos con formaldehído 4% en PBS-0,1% Tween20, se realizaron varios lavados con PBS-0,1% Tween20 y se guardaron a -20° C en Solución de Hibridación (50% Formamida, SSC 5X, 100 µl/mg ADN de esperma de salmón, 50µg/mg heparina y 0,1% Tween20). Tras 2 horas de pre-hibridación a 55° C en Solución de Hibridación se llevó a cabo la hibridación a 55° C con 2µl de sonda (desnaturalizada a 80°C durante 10 minutos) en 100µl de Solución de Hibridación durante toda la noche. El exceso de sonda se lavó a 55° C con Solución de Hibridación y con solución HYBE (50% Formamida y SSC5X) + PBS-0,1% Tween20. Para la detección de la sonda se realizó una incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo Anti-Digoxigenina (Roche™) en una dilución 1:4000. Para el revelado se empleó Solución de Color (100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl pH 9,5 y 0,1% Tween20) a la que se añadió NBT y BCIP (Roche™). El tiempo de revelado fue de entre 5 minutos y 1 hora, dependiendo de cada sonda, tras lo cual se realizaron varios lavados con PBS-0,1% Tween20.

## 9. Preparación de discos imaginales y tratamiento de imágenes

El medio de montaje en el que se prepararon los discos imaginales en los cuales se había realizado una hibridación “*in situ*” fue glicerol al 70%. Las imágenes se captaron con una cámara Spot digital acoplada a un microscopio Zeiss Axioplan™. Las imágenes se adquirieron utilizando software Adobe Photoshop™CS4. Los discos imaginales en los que se realizaron tinciones inmunohistoquímicas se prepararon en el medio de montaje Vectashield® (Vector Laboratories™). Las imágenes de microscopía confocal fueron capturadas en un microscopio confocal LSM510™. El posterior procesamiento de las imágenes se realizó con los programas Metaview™ (Meta Imaging Corporation Plus), Adobe Photoshop™ CS4 e ImageJ 1.46.

## 10. Preparación de alas adultas y cuantificación del tamaño del ala

Las preparaciones de cutículas adultas se realizaron en un medio de montaje compues-

to por ácido láctico/etanol (6:5). Las imágenes se captaron con una cámara digital Spot acoplada a un microscopio Zeiss Axioplan™. Para calcular el tamaño de las alas adultas se fotografiaron al menos 10 alas de hembras correspondientes a los diferentes genotipos a cuantificar, a un aumento de 5X, y se midió su área en píxeles con el programa Adobe-Photoshop™ CS4.

### 11. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los fenotipos de alas adultas se examinaron al menos 10 alas de hembras de cada genotipo, y del mismo modo se analizaron 10 discos imaginales de ala en cada tinción inmunohistoquímica. Los datos de tamaño del ala, tamaño del disco imaginal, tamaño celular, número de células y los ratios entre los números de células se expresan como la media +/- la desviación estándar de la media (+/-SEM) y fueron comparados usando una prueba T de Student. Se considera significativo un “p-value” menor que 0.005. Todos los datos fueron almacenados y calculados utilizando el programa Microsoft Excel 2008. Las figuras fueron tratadas con el programa Adobe-Photoshop™ CS4.

### 12. Cálculo del índice mitótico en discos imaginales

Se cuantificó el número de células en mitosis, detectadas por la expresión de fosfo-Histona 3 (PH3) en la región central del disco imaginal de ala en el tercer estadio larvario, así como el tamaño de la correspondiente región. Fue utilizado como índice mitótico la media de los valores de los cocientes entre el número de células en mitosis y el área de la región central. Las imágenes utilizadas para realizar este análisis fueron proyecciones de 20 planos focales de un mismo disco. Se utilizaron un mínimo de 10 discos por genotipo estudiado.

### 13. Análisis bioinformático de regiones reguladoras

El análisis bioinformático de las regiones promotoras de los 34 genes candidatos (C) y 41 genes control (NC) se realizó seleccionando las secuencias promotoras (1000 pares de bases precedentes al sitio de inicio de la transcripción (TSS)) de dichos genes. Posteriormente se compararon dichas regiones con cuatro sitios de unión al ADN descritos para estas proteínas, tanto en vertebrados como en invertebrados (de Celis and Barrio, 2009):

- Un sitio de unión descrito para Spalt related de *Drosophila melanogaster* (Barrio et al., 1996):  
TTATGAAAT
- Un sitio de unión descrito para Sall1 de vertebrados (Yamashita et al., 2007):

ATAA(A/T)(A/T)

- Dos sitios de unión descritos para Sall4 de vertebrados (Wu et al., 2006):

AATTATTGCCCGATTTCAT

TTAACATTCCTTTCCC

Para realizar dicha comparación previamente se construyeron tres modelos de predicción de unión diferentes. Cada modelo fue construido bien directamente usando la secuencia consenso o bien por la frecuencia de cada nucleótido en la alineación de los sitios (matrices de posición de peso):

- Modelo 1: Se utilizó para la construcción de este modelo la secuencia de unión descrita para Salr de Drosophila:

	A	C	G	T
1	0	0	0	1
2	0	0	0	1
3	1	0	0	0
4	0	0	0	1
5	0	0	1	0
6	1	0	0	0
7	1	0	0	0
8	1	0	0	0
9	0	0	0	1

- Modelo 2: Para la construcción de este modelo se utilizó la matriz de posición de peso detallada en (Yamashita et al., 2007) para el sitio de unión descrito para Sall1 en vertebrados:

	A	C	G	T
1	18	0	0	0
2	0	0	0	18
3	17	0	0	1
4	17	0	0	1
5	13	0	1	4
6	11	2	1	4
7	12	2	0	4
8	10	0	2	6

- Modelo 3: El modelo 3 fue construido teniendo en cuenta las cuatro secuencias de unión seleccionadas para este estudio. Para ello se realizó un alineamiento de las secuencias usando el programa informático ClustalW:

	A	C	G	T
1	4	0	0	0
2	0	0	1	3
3	1	0	3	0
4	4	0	0	0
5	4	0	0	0
6	3	0	0	1
7	1	0	1	2

Se comparó cada uno de estos modelos con el listado de las secuencias promotoras de los genes en cuestión mediante la utilización del programa informático MatScan (Blanco et al., 2006), con el cual se escaneó cada secuencia promotora, los 1000 pares de bases 5' al inicio de transcripción en ambas hebras, utilizando el 85% como umbral de rigor. Se analizó la conservación del conjunto de posibles secuencias de unión de las proteínas Spalt frente a 12 especies de *Drosophila* mediante el programa informático UCSC Genome Browser. Los sitios de unión al ADN que estuvieran conservados en 5 o más especies, incluyendo al menos *Drosophila pseudoobscura* (o cualquier otra especie más distante) fueron seleccionados como posibles sitios de unión al ADN de las proteínas Sal.



## Resultados



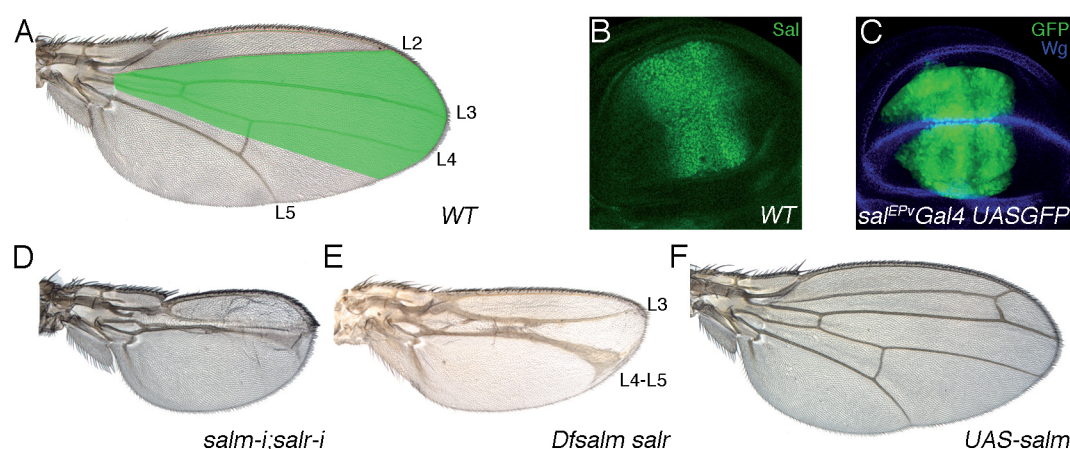


## 1. Análisis de las funciones de Sal durante el desarrollo del ala

### 1.1. Fenotipos asociados a la falta y sobre-expresión de los genes *sal* en el ala

La expresión de *salm* y *salr* está regulada por la ruta de señalización Dpp en el disco de ala, y ocurre en un territorio que corresponde en el ala adulta a la región comprendida entre la vena L2 y la intervena L4-L5 (Figura 10A-B). La reducción de la expresión de *salm* y *salr* mediante la expresión de sus ARN-i en la región central del ala utilizando la línea *sal<sup>EPv</sup>-Gal4* (*UAS-dicer*; *sal<sup>EPv</sup>-Gal4* *UAS-GFP/UAS-salm-i*; *UAS-salr-i/+*; Figura 10C), presenta un fenotipo similar al causado por la eliminación de estos genes utilizando una deficiencia genética (*638-Gal4/+*; *FRT40 Df(2L)32FP5/FRT40 M(2)z*; *UAS-FLP/+*) (Figura 10D, E). Este fenotipo consiste en una reducción del tamaño del ala, la falta de la vena L2, y la fusión y desplazamiento anterior de las venas L4 y L5 (Barrio et al., 1999). Estos datos indican que la función de los genes *sal* durante el desarrollo de la región central del ala se revelan reduciendo su expresión mediante el uso de ARNs de interferencia, validando así su uso para posteriores experimentos. La sobre-expresión de *sal* en su dominio normal de expresión presenta un fenotipo de venas ectópicas en la región comprendida entre la vena L2 y L3 (Figura 10F), mientras que la expresión ectópica de *salm* o *salr* resulta en fenotipos fuertes de reducción del tamaño del ala y defectos en el patrón de venas (de Celis et al., 1996a). Estos datos indican que la ausencia de los genes *sal* produce problemas en el crecimiento y la diferenciación de la región central del ala, mientras

que la sobre-expresión homogénea de estos genes en dicha región no altera sustancialmente su desarrollo.



**Figura 10. Fenotipos de la falta de expresión de los genes *sal*.** (A) Ala silvestre donde se indica el territorio de expresión de los genes *salm* y *salr* (verde) y las venas longitudinales (L2-L5). (B) Expresión de Salm (verde) en disco imaginal de ala silvestre de larva III. (C) Expresión de Wingless (azul) y GFP (verde) en discos imaginales de ala de tercer estadio larvario de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+*. (D) Fenotipo de la reducción de la expresión de *salm* y *salr* en moscas de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+*. Estos individuos presentan un fenotipo de reducción del tamaño del ala y pérdida de la vena L2 y fusión de las venas L4/L5. (E) Alas mosaico de genotipo *638-Gal4; Df(2L)32FP5 FRT40A/M(2)z FRT40A; UAS-FLP/+*. En estas alas la mayoría del territorio de ala es homocigótico para la deficiencia de los genes *sal*. (F) Ala de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+;UAS-salm/+*. La sobre-expresión de *salm* en su dominio normal de expresión, causa un fenotipo de venas ectópicas en la región comprendida entre las venas L2 y L3.

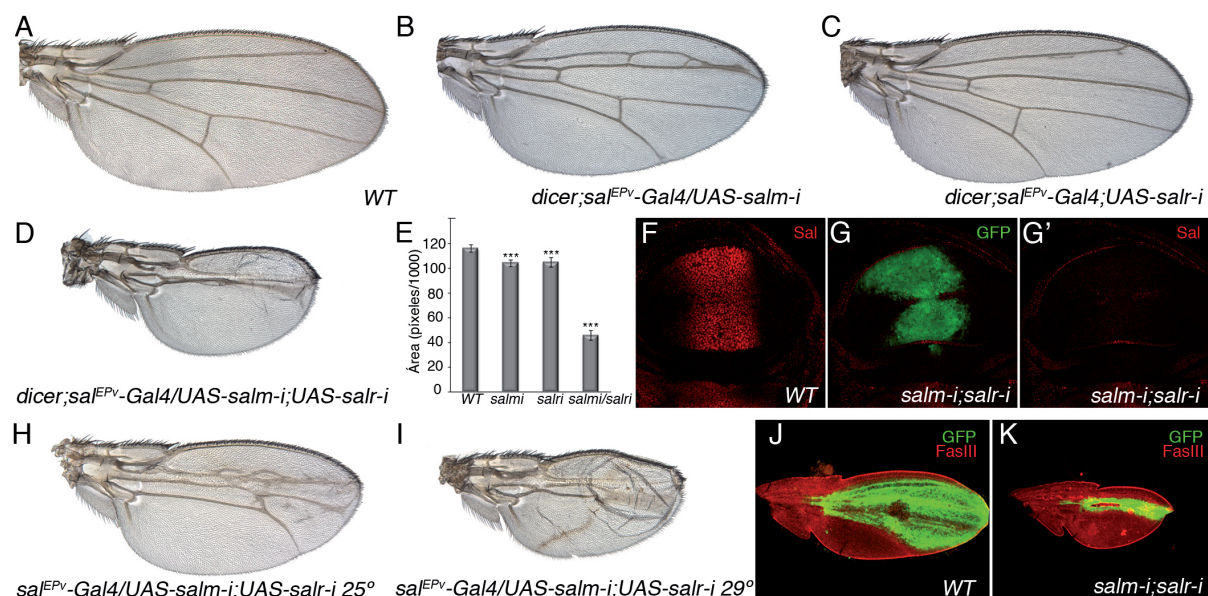
Ya que la reducción de la expresión de los genes *sal* resulta en fenotipos parecidos usando ARN de interferencia o una deficiencia genética, se ha empleado para realizar el análisis de las funciones de estas proteínas las siguientes combinaciones:

- Clones de la *Df(2L)32FP5*, que elimina tanto *salm* como *salr*.
- *UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+*
- *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*
- *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+*
- *UAS-salm-i; dpp-Gal4 UAS-GFP/UAS-salr-i/+*

#### 1.2. Análisis de la falta de función mediante interferencia génica de los genes *sal*: *UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+*

Para estudiar las consecuencias de la falta de función de las proteínas Sal en su dominio de expresión durante las distintas etapas del desarrollo del ala, se dirigió la expresión de ARNs de interferencia contra *salm* y/o *salr* utilizando la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4*. Al reducir la expresión de

cada uno de los genes del complejo *sal* por separado en la región central del disco de ala (*UAS-dicer*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-salm-i* y *UAS-dicer*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4;UAS-salr-i*), se observa la formación de alas de menor tamaño que las alas silvestres, 104259 (sd. 2851) y 105004 (sd. 3898) píxeles, respectivamente, comparado con 115927 (sd. 2898) píxeles para las alas silvestres. En ambos casos sólo observamos con baja frecuencia un acercamiento de las venas L2 y L3 (Figura 11B, C, E). La reducción de los niveles de la proteína Salm tras la expresión de su ARN-i fue confirmada mediante inmunolocalización de Salm en discos imaginales de ala (Figura 11G', comparar con Figura 11F). La reducción de ambos genes a la vez causa una reducción del tamaño del ala más drástica, 45914 píxeles (sd. 3894), y la formación de las venas no ocurre correctamente: la vena L2 no aparece y las venas L4 y L5 aparecen fusionadas (Figura 11D, E). A mayor grado de reducción de los niveles de proteínas Sal se observa una progresiva reducción del tamaño del ala y alteración en el patrón de venas (Figura 11D, H, I). En el caso más extremo, cuando estos experimentos se realizan en un fondo genético de sobre-expresión del gen *dicer*, cuya presencia aumenta la eficacia de la interferencia por el ARN-i (Dietzl et al., 2007), las alas son muy similares a las alas homocigóticas para la deficiencia de *salm* y *salr* (Figura 11D, comparar con Figura 10E). En los discos imaginales de este genotipo, la región central del ala, marcada en verde por la proteína GFP, es también menor que su equivalente en discos imaginales silvestres (Figura 11G, comparar con Figura 10C), aunque esta disminución no es tan acusada como la observada en el ala adulta. En alas pupales de 36-40 horas APF (*After Pupa-rium Formation*), observamos que la disminución de la región central (GFP) respecto al disco imaginal es más acusada (Figura 11K), siendo la morfología y tamaño de las alas pupales muy semejante a la observada en alas adultas (Figura 11K, comparar con Figura 11D). Esta disminución paulatina a lo largo del desarrollo puede ser debida a diferentes causas tales como falta de proliferación celular, apoptosis o eliminación del epitelio de las células de la región central.



**Figura 11. Falta de función de los genes *sal* y desarrollo del dominio de expresión de *Sal* en discos y alas pupales mutantes para *sal*.** (A) Ala silvestre. (B-D) Fenotipo de la reducción de la expresión de *salm* y *salr* en moscas de genotipo *UAS-dicer/+;sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i* (*salm-i* en B) y *UAS-dicer/+;sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+;UAS-salr-i/+* (*salr-i* en C). (D) La reducción de la expresión de ambos genes (*UAS-dicer/+;sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+*) presenta un fenotipo más fuerte de reducción de tamaño y pérdida de la vena L2. (E) Cuantificación del tamaño del ala (medido en píxeles/1000) de alas de genotipo silvestre (WT), *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i* (*salm-i*), *UAS-dicer/+;sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+; UAS-salr-i/+* (*salr-i*) y *UAS-dicer/+ sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/ UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (*salm-i/salr-i*). Las barras representan la media +/- la desviación estándar de la media (SEM). \*\*\*p-value < 0.005. (F) Expresión de Salm (rojo) en un disco imaginal de ala silvestre. (G-G') Expresión de GFP (verde) y Salm (rojo) en discos imaginales de larva III de genotipo *UAS-dicer/+;sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+*. La expresión de Salm se pierde totalmente (G'). (H-I) Fenotipo de alas *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+* a 25° (H) y 29° (I). (J-K) Expresión de GFP (verde) y FasIII (rojo) en alas pupales 36-40 h APF de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+* (J) y *UAS-dicer/+;sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+* (K).

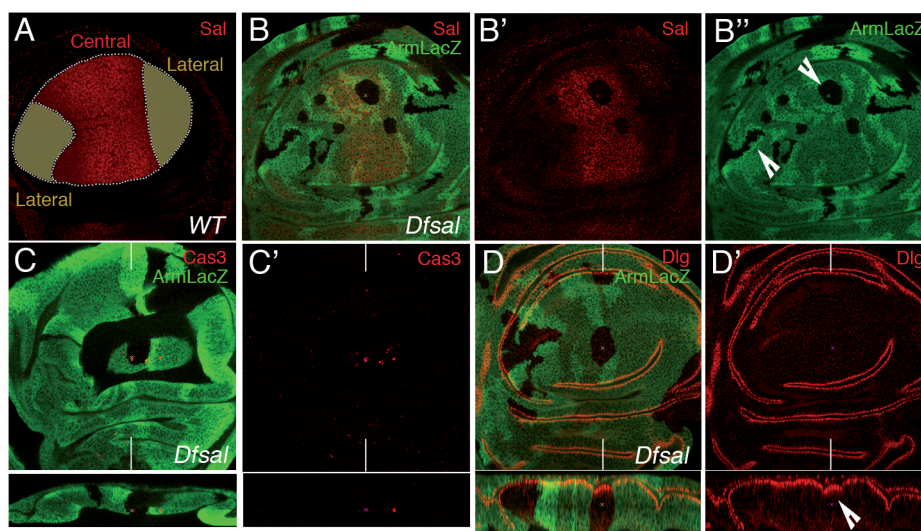
### 1.3. Papel de las proteínas *Sal* en la proliferación celular

#### 1.3.1. Análisis clonal de la deficiencia de los genes *sal*: *Df(2L)32FP5*

Hemos estudiado las consecuencias de la falta de *sal* en diferentes regiones del ala y el efecto de confrontar células que expresan diferentes niveles de *sal*. Para ello, se generaron clones de células homocigóticas para la deficiencia *Df(2L)32FP5* (*hsFLP1.22/+; Df(2L)32FP5 FRT40/armlacZ FRT40*). Los clones se indujeron 48-72h AEL (After Egg Laying), y se identificaron por la ausencia del marcador *lacZ* en discos imaginales de ala de tercer estadio. Para su análisis se distinguió la zona presuntiva de la región central del ala, que corresponde al dominio de expresión de las proteínas *Sal*, y las regiones laterales del disco, que corresponden a las regiones más anterior y posterior del ala donde los genes *sal* no se expresan (Figura 12A). Los clones mutantes en la región central del ala presentan una morfología redondeada y son más pequeños que sus clones hermanos silvestres correspondientes (Figura 12B-B''), como



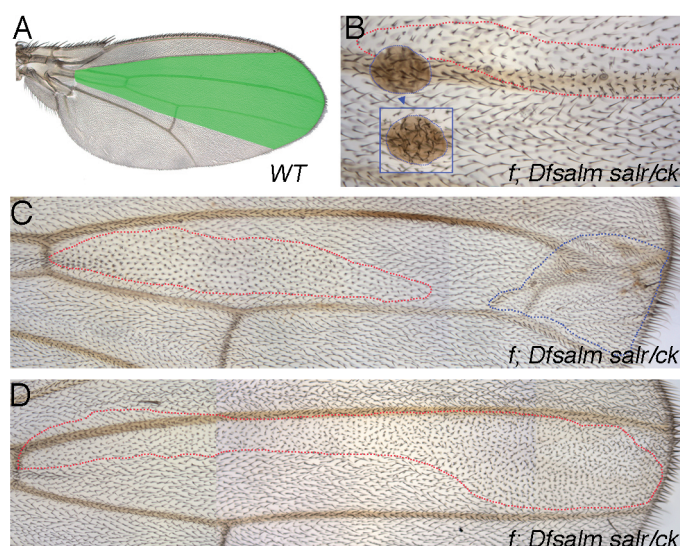
ya se describió previamente (Milan et al., 2002), sugiriendo alteraciones en reconocimiento y proliferación celular. Aproximadamente en el 30% de los casos el clon mutante no aparece en la proximidad de un clon hermano, indicando que las células *Dfsal* o no proliferan, o son eliminadas por apoptosis o extruidas del epitelio. Para estudiar la implicación de la muerte celular en este fenotipo, se realizaron tinciones inmunohisquímicas con anticuerpo anti-Caspasa-3 activada (marcador de muerte celular) en estos clones. Este marcador lo encontramos sólo en algunas células mutantes (Figura 12C'), lo que nos indica que los clones *sal* no desaparecen por muerte celular en este momento del desarrollo. Para estudiar si la falta de clones está relacionada con problemas en la integridad epitelial, estudiamos la expresión de distintas moléculas de adhesión que delimitan los perfiles celulares, y observamos que algunos clones mutantes están separados de sus células vecinas por surcos epiteliales (Figura 12D'), pudiendo ser indicativo de problemas de adhesión entre las células mutantes y silvestres que podrían ser responsables de la desaparición de las células mutantes por extrusión epitelial.



**Figura 12. Clones de falta de función de los genes *sal*.** (A) Disco imaginal de tercer estadio larvario mostrando la expresión de Salm (rojo) en la región central, y en sombreado marrón las regiones laterales. (B-B'') Clones *Df(2L)32FP5* (*hsFLP1.22/+; Df(2L)32FP5 FRT40/armLacZ FRT40*), que se aprecian por la falta de verde. En estos discos se muestra la expresión de Arm-LacZ (verde en B'') y Salm (rojo en B'). Nótese que los clones mutantes en la región central son más pequeños y redondos que sus clones gemelos (marcados en verde intenso), mientras que en las regiones laterales los clones homocigóticos *Df(2L)32FP5* y sus clones gemelos son de igual tamaño (flechas). (C-C') Expresión de Arm-LacZ (verde) y Cas3 activada (rojo en C') en clones *Df(2L)32FP5*. (D-D') Expresión de Arm-LacZ (verde) y Dlg (rojo en D'). Los clones mutantes de *sal* muestran pliegues epiteliales con las células vecinas silvestres. Debajo de los paneles C-D' se muestran las secciones transversales de estos discos.

También estudiamos el comportamiento de clones homocigóticos *Df(2L)32FP5* en alas adultas de genotipo  $f^{36a}$  *hsFLP1.22; Df(2L)32FP5FRT40/ck P[f']30F FRT40*. En este caso, los clones *Dfsal* se identificaron por la presencia del marcador celular *forked* (*f*), y los clones gemelos por el marcador *crinkled* (*ck*). Los clones se indujeron mediante irradiación (1500R) a las 48-72 horas y 72-96 horas AEL. En la región central de ala (Figura 13A) se analizaron 15 clones mutan-

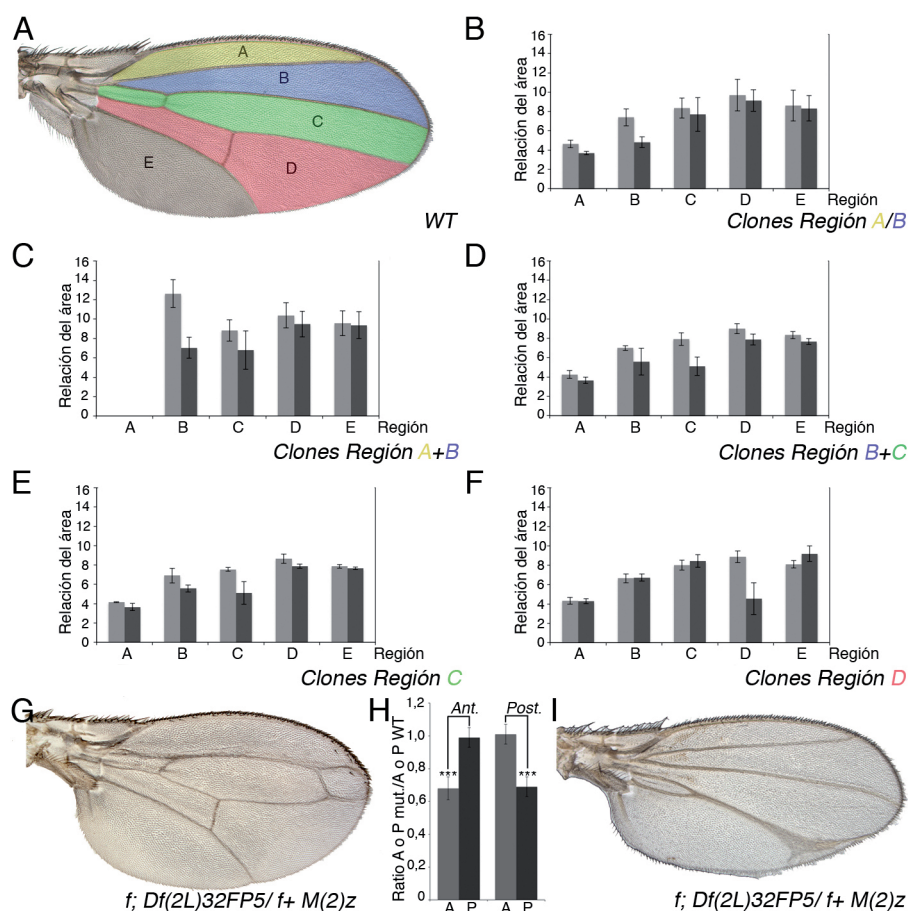
tes con sus clones hermanos silvestres generados a 48-72 horas y 20 clones mutantes con sus clones hermanos silvestres generados a 72-96 horas, y en el 67% y 75% de los casos analizados respectivamente, sólo encontramos el clon hermano silvestre (Figura 13B-D). Este análisis revela que el porcentaje de clones hermanos silvestres sin clon mutante asociado es menor en el disco imaginal (30%) que en el ala adulta (60%). Este hecho indica que una fracción de los clones observados en el disco imaginal no culminan su diferenciación en el ala adulta. Este comportamiento podría explicarse si parte de los clones mutantes que proliferan durante el desarrollo imaginal no son capaces de diferenciarse en el ala adulta, bien porque estas células sufran apoptosis durante el desarrollo pupal, o bien porque estas células sean eliminadas del epitelio en este periodo del desarrollo.



**Figura 13. Análisis clonal de la deficiencia genética de *salm* y *salr*.** (A) Ala silvestre donde se indica el dominio de expresión de *salm* y *salr* (verde). (B-D) Ejemplos de clones *Df(2L)32FP5* inducidos en larvas de genotipo *f<sup>360</sup>; Df(2L)FP5 FRT40/ck P[f<sup>+</sup>]30B FRT40* a 48-72 horas después de la puesta del huevo. (B) Clon gemelo identificado por la presencia del marcador *ck* (línea roja) asociado a vesículas de células localizadas entre las superficies dorsal y ventral del ala (línea azul y recuadro azul). (C) Clon gemelo (línea roja) y clon *Dfsal* causando defectos en el patrón de las venas L3 y L4. (D) Clon gemelo sin clon *Dfsal* asociado.

Para determinar los efectos de la falta de *sal* sobre el crecimiento de las diferentes regiones del ala (Figura 14A), realizamos clones Minute<sup>+</sup> de la deficiencia *Df(2L)32FP5* en individuos *f<sup>360</sup>; Df(2L)32FP5 FRT40/M(2)z P[f<sup>+</sup>]30B FRT40* (Figura 14). Se seleccionaron los individuos con clones y se analizó tanto el ala con clon como el ala contralateral sin clon, comparando los tamaños de las diferentes regiones de cada ala. Las alas que presentan clones en las regiones A+B, B+C, C, y D muestran una reducción muy acusada de la región o regiones correspondientes (Figura 14A-F), indicando que *sal* es requerido en dicha región para su crecimiento. En el caso de alas que presentan clones en la posición D observamos tanto una fuerte reducción del tamaño de la región D como un aumento del tamaño de la región E (Figura 14F), posiblemente resultado del cambio de posición de la vena L5. Los clones restringidos a la región E no muestran, como es de esperar, ningún fenotipo, ya que las proteínas Sal no se expresan en este territorio. De igual modo se analizaron los efectos de la falta de *sal* sobre el crecimiento de los compartimentos anterior y posterior (Figura 14G-I). Se seleccionaron los individuos con clones

en el compartimento anterior o posterior y se analizó tanto el ala con clon como el ala contralateral sin clon, comparando los tamaños de cada compartimento. Las alas que presentan clones en la región anterior o posterior están disminuidas en tamaño respecto a las alas contralaterales, y esta reducción se debe fundamentalmente al compartimento mutante (Figura 14H). Estos datos indican que la falta de las proteínas Sal causa un defecto en el crecimiento del ala de manera autónoma celular.

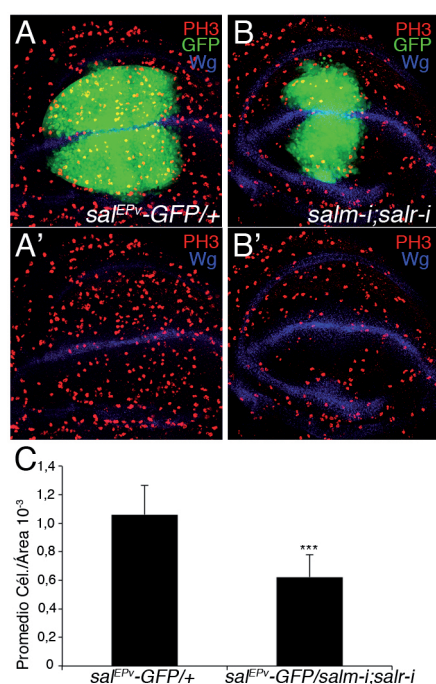


**Figura 14. Análisis clonal de la deficiencia de *salm* y *salr* en fondo *Minute*\*.** (A) Ala silvestre mostrando las regiones de interviena A (amarillo), B (azul), C (verde), D (rojo) y E. (B-F) Cuantificación de la reducción del tamaño de las regiones de interviena del ala causado por clones  $f^{36a} Df(2L)32FP5 M^+$  en moscas de genotipo  $f^{36a} Df(2L)FP5 FRT40/ M(2)z P[f^{+}]30B FRT40$  inducidos a las 48-72 horas después de la puesta del huevo. Las barras gris oscuro muestran el tamaño medio de las regiones de interviena en alas con clones y las barras gris claro muestran el tamaño medio de las regiones de interviena de las alas contralateral correspondientes sin clones. Clones homocigóticos  $Df(2L)32FP5 M^+$  localizados en regiones A o B (B), clones que ocupan ambas regiones A y B (C), clones solapando las regiones B y C (D), clones en la región C (E) y en la región D (F). (G-I) Alas mosaico con clones con  $M^+$  en el compartimento anterior (G) y posterior (I). (H) Cuantificación de la reducción del tamaño de cada compartimento. Las barras representan el tamaño medio de cada compartimento (gris oscuro anterior, gris claro posterior)  $\pm$  SEM. Las dos columnas de la izquierda representan el tamaño medio de los compartimentos de alas con clones en el compartimento anterior, y las columnas de la derecha son de alas con clones en el compartimento posterior. \*\*\*p-value<0.005.



### 1.3.2. Análisis de la reducción de la expresión de los genes *sal*: *UAS-dicer*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+* en la proliferación celular

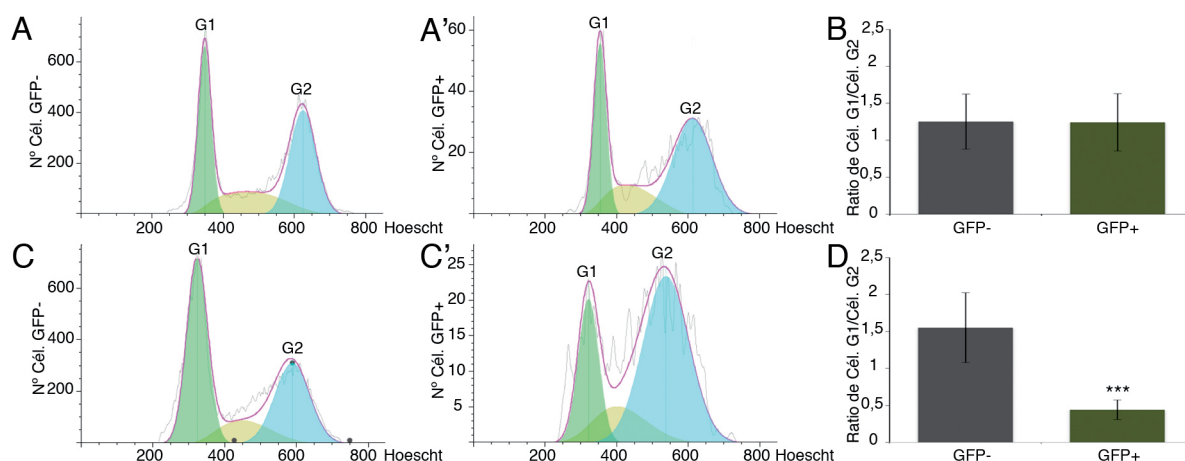
Los análisis clonales de la falta de los genes *sal* revelan un papel de estos genes en el control del tamaño final del ala. También observamos una disminución del tamaño de la región central del ala en individuos *salm-i/salr-i*. Estos datos nos revelan que los genes *sal* podría contribuir a la proliferación celular de la región central del disco de ala. Para analizar esta posibilidad, comparamos el índice mitótico en el dominio de expresión de los genes *sal* (marcado en verde por la proteína GFP) en discos imaginales de ala de tercer estadio del genotipo de estudio con el mismo dominio de discos imaginales de ala de genotipo *UAS-dicer*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UASGFP/+*. Calculamos el índice mitótico como la media del número de células en mitosis (marcadas con Fosfo-Histona 3 -PH3-) por unidad de área en 20 discos (Figura 15A-B'). Encontramos una disminución significativa de la proliferación en la región central de discos imaginales de ala *UAS-dicer*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*, con un índice mitótico de 0,0006 (sd. 0,0002), en comparación con discos imaginales control de genotipo *UAS-dicer*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+*, cuyo índice mitótico es de 0,001 (sd. 0,0002) (Figura 15C).



**Figura 15. La falta de las proteínas Sal disminuye el número de células en mitosis.** (A-B) Expresión de GFP (verde), Wingless (azul) y PH3 (rojo) en discos imaginales de genotipo *UAS-dicer/+*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+* (control) (A-A') y *UAS-dicer/+*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (B-B'). (C) Índice mitótico del control (columna derecha) y de *UAS-dicer/+*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (columna izquierda). \*\*\*p-value<0.005.

Dado que observamos una disminución de células en mitosis al reducir la expresión de Sal, decidimos analizar si la falta de función de Sal produce algún cambio en alguna de las fases del ciclo celular de las células imaginales. Para ello utilizamos la técnica de FACS (ver materiales y métodos) en discos imaginales *UAS-dicer*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* y en discos control *UAS-dicer*; *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+* (Figura 16). Encontramos que el perfil del

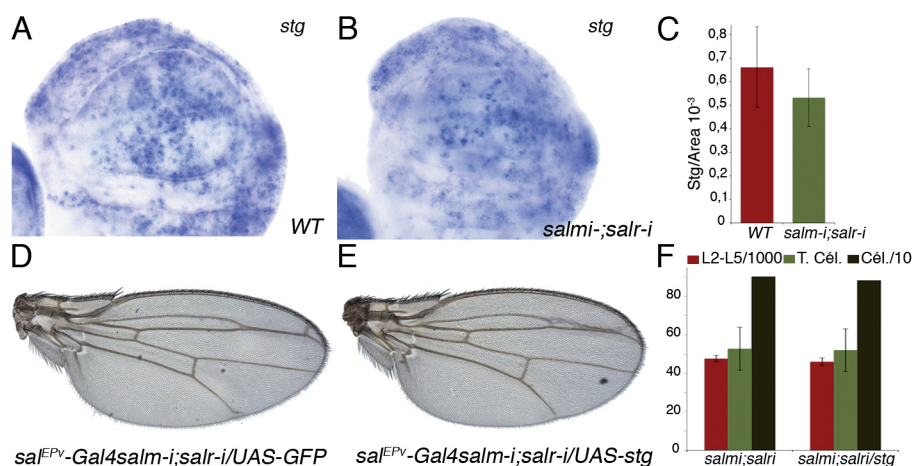
ciclo celular de las células imaginales de la región central del ala varía al reducir la expresión de *Sal* en comparación al de células imaginales silvestres, observándose un aumento de la fracción de células imaginales en la fase G2 del ciclo celular (Figura 16A', C'). Así, el ratio G1/G2 de las células imaginales es de 0,44 (sd. 0,13) tras la reducción de *salm* y *salr*, mientras que en condiciones silvestres es de 1,2 (sd. 0,38) (Figura 16B, D). Por tanto, podemos concluir que las proteínas *Sal* se requieren para la progresión del ciclo celular, donde podrían regular



**Figura 16. Las proteínas *Sal* promueven la progresión del ciclo celular.** (A-A') Perfil del ciclo celular de células imaginales localizadas fuera del dominio de expresión *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* (células GFP negativas, A) y de células localizadas en dicho dominio (células GFP positivas, A'), de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+*. (B) Promedio de células en G1/G2 de cinco experimentos independientes. No se observan diferencias en la fracción G1/G2 entre células GFP negativas (columna de la izquierda) y positivas (columna de la derecha). (C-C') Perfil del ciclo celular de células imaginales localizadas fuera del dominio *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* (células GFP negativas, C) y de células localizadas en dicho dominio (células GFP positivas, C'), de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*. (D) Promedio de células en G1/G2 entre células GFP negativas (columna de la izquierda) y positivas (columna de la derecha) de cinco experimentos independientes. Existe una acumulación de células GFP positivas en la fase G2. \*\*\*p-value< 0.005.

algún componente implicado en la progresión de la fase G2 del ciclo celular a la fase M. El gen *string* (*stg*) codifica una proteína tirosina-fosfatasa que promueve la transición G2/M (Edgar and O'Farrell, 1990; O'Farrell et al., 1989), y, dado que la falta de función de las proteínas *Sal* impiden la progresión del ciclo celular en la fase G2, esto nos sugiere que dichas proteínas podrían estar regulando la expresión de *stg*. Para analizar esta posibilidad se realizó una hibridación *in situ* del gen *stg* en discos imaginales de ala donde se redujo la expresión de los genes *sal* (*UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*) y en discos control (*UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+*), observándose una disminución de la expresión del gen *stg* (Figura 17A-C), indicando que los problemas en la progresión del ciclo celular causados por la falta de las proteínas *Sal* podrían ser debidos a la falta de expresión del gen *stg*. Se realizaron combinaciones genéticas donde se reducía la expresión de los genes *sal* a la vez que se sobre-expresaba la expresión del gen *stg*, *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-salm-i/+; UAS-salr-i/UAS-stg*, y se comparó el tamaño de dichas alas adultas con sus correspondientes alas control, donde se redujo la expresión de

los genes *sal* únicamente, *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-salm-i/+; UAS-salr-i/UAS-GFP*, no observándose un rescate de tamaño significativo (Figura 17D-F). Se analizó también el tamaño celular y el número de células en ambos casos, no observándose ningún efecto de rescate (Figura 17F). Estos datos indican que la falta de progresión G2/M observada en células mutantes *Sal* no se debe a defectos en la expresión de *stg*.

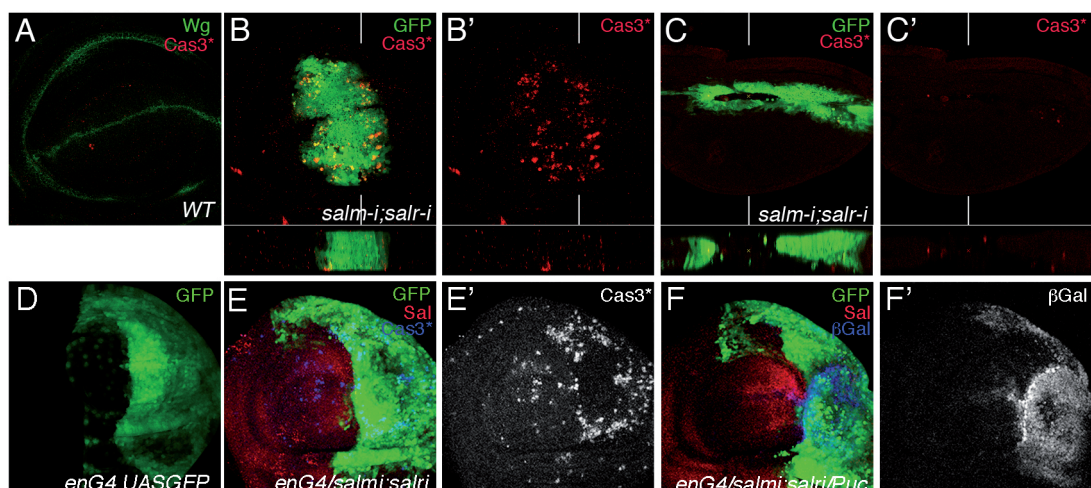


**Figura 17. La sobre-expresión de la fosfatasa *stg* no rescata la disminución del tamaño del ala por la falta de las proteínas *Sal*.** (A-B) Expresión de *stg* en discos de tercer estadio silvestres (A) y *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (B). (C) Cuantificación relativa del número de células expresando *stg* entre el área de la región del ala del disco en discos control (columna de la izquierda) y *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (columna de la derecha). (D-E) Alas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-salm-i/+; UAS-salr-i/UAS-GFP* (D) y *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-salm-i/+; UAS-salr-i/UAS-stg* (E). (F) Cuantificación del área/1000 comprendida entre las venas L2 y L5 (columnas rojas), tamaño celular (columnas verdes) y número celular/10 (columna gris) en alas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-salm-i/+; UAS-salr-i/UAS-GFP* (columnas de la izquierda) y *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-salm-i/+; UAS-salr-i/UAS-stg* (columnas de la derecha). Las barras representan la media  $\pm$  SEM en las columnas rojas y verdes y el número celular en las columnas grises.

#### 1.4. Papel de las proteínas *Sal* en el control de la muerte celular

Para estudiar la relación entre muerte celular y la falta de función de *sal*, se estudió la presencia de Caspasa-3 activada tanto en discos imaginales de tercer estadio larvario como en alas pupales de 36-40 horas APF (*UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*). En condiciones silvestres no observamos expresión de Caspasa-3 activada en ninguno de estos estadios (Figura 18A) (Milan et al., 1997). En discos imaginales de tercer estadio larvario con expresión reducida de *sal* observamos células que presentan tinción de anti-Caspasa-3 activada en la región central del ala (Figura 18B'). En alas pupales de 36-40 horas APF del mismo genotipo no se observa expresión de Caspasa-3 activada (Figura 18C'). De esta forma, la reducción de las proteínas *Sal* en discos imaginales de tercer estadio causa muerte celular, que aparece concentrada en las regiones de contacto entre células pertenecientes y no al dominio de expresión de *Sal*. Sin embargo, la falta de *Sal* no causa muerte celular en alas pupales, que es cuando observamos mayoritariamente la eliminación de las células del dominio central.

También observamos presencia de Caspasa-3 activada en discos imaginales de ala donde hay células expresando *sal* en la región anterior y células que no expresan *sal* en la región posterior (*en-Gal4 UASGFP/ UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*). Aquí se observa inducción de muerte celular localizada a lo largo del borde de confrontación de expresión de *sal* (Figura 18E, E').



**Figura 18. Expresión de Caspasa3 activada en condiciones de falta de los genes *sal*.** (A) Expresión de Cas3 activada (Cas3\*, rojo) y Wg (verde) en disco de tercer estadio silvestre. (B-B') Expresión de Cas3 activada (Cas3\*, rojo) y GFP (verde) en discos de genotipo *UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*. La expresión de Cas3 activada es mayor en la periferia del dominio de Sal. (C-C') Expresión de Cas3 activada en alas pupales de 36-40 APF de genotipo *UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*. Abajo se muestran las secciones transversales de cada imagen. (D) Expresión de GFP (verde) utilizando la línea *en-Gal4* en larva III silvestre. (E-E') Expresión de GFP (verde), Salm (rojo) y Cas3 activada (Cas3\*, azul, y blanco en E') en discos de tercer estadio de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*. La expresión de Cas3 activada es detectada a lo largo del borde antero-posterior. (F-F') Activación de la ruta de señalización JNK en el compartimento posterior de discos de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/puc-LacZ*. La expresión de *puc-lacZ* (azul en F y blanca en F') se detecta en todo el compartimento posterior.

La muerte celular que observamos en discos imaginales de ala tras la reducción de la expresión de las proteínas Sal puede ser debida a la activación de la vía de señalización JNK (Jun N-Terminal Kinase). Esta vía de señalización está activa en momentos precisos del desarrollo en diferentes órganos de *Drosophila* (Galko and Krasnow, 2004; Igaki et al., 2002; Jacinto et al., 2002; Kallio et al., 2005; Manjon et al., 2007; Martin-Blanco et al., 2000; Pastor-Pareja et al., 2004; Pastor-Pareja et al., 2008; Shen and Dahmann, 2005; Stronach and Perrimon, 2002; Zeitlinger and Bohmann, 1999). En el ala, tiene un papel fundamental durante la evaginación del disco imaginal, encontrándose activa en la membrana peripodial (Pastor-Pareja et al., 2004). Esta ruta también está encargada de eliminar mediante apoptosis a las células que han sido dañadas (Perez-Garijo et al., 2004). La activación de la ruta desencadena una cascada de fosforilaciones hasta la proteína JNK Basket (Bsk) (Riesgo-Escovar et al., 1996), que finalmente fosforila a los factores de transcripción Jun y Fos que promueven la transcripción de diferentes genes implicados en las diferentes funciones de la ruta. Entre estos está el gen *puckered* (*puc*),

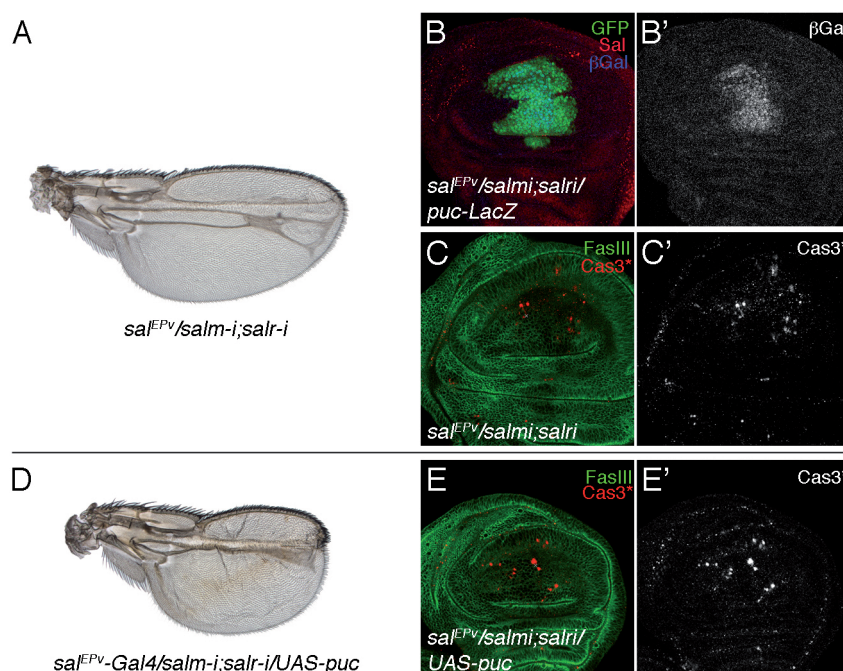


que codifica una fosfatasa cuya función es regular negativamente la señalización JNK mediante la desfosforilación de Bsk (Martin-Blanco et al., 1998).

Para determinar si la muerte observada en discos imaginales de ala de tercer estadio tras la reducción de las proteínas Sal está mediada por la ruta de señalización JNK, decidimos analizar la presencia de la fosfatasa Puc. En discos imaginales de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/puc-LacZ* observamos expresión del reportero *puc-lacZ* (Figura 19B-B'), acompañada por una expresión mas restringida de Cas3 activada (Figura 19C-C'). Esta activación también la observamos en discos imaginales de ala dónde se reduce la expresión de los genes *sal* en el compartimento posterior, *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/puc-LacZ* (Figura 18F-F'). Estos resultados sugieren que la muerte celular podría ser debida a la activación de la ruta de señalización JNK. Para corroborar estos resultados, mediante combinaciones genéticas variamos la actividad de la ruta JNK sobre-expresando Puc, con lo que inactivamos la ruta. Los discos imaginales de este genotipo (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-salm-i;UAS-salr-i/UAS-puc*) siguen presentando muerte celular, observada por la tinción de anti-Cas3 (Figura 19E-E'), indicando que ésta no es debida a la activación de la ruta de señalización JNK. Es de destacar que las alas de este genotipo presentan un fenotipo más exagerado que el de las alas en las que sólo se reduce la expresión de Sal (Figura 19D, comparar con 19A). Estos resultados nos indican que en la ausencia de las proteínas Sal se activa la señalización de la ruta JNK, pero que los niveles de activación de esta ruta no son capaces de activar la apoptosis. Es posible que la activación de la vía JNK en ausencia de Sal/Salr esté más relacionada con los problemas de integridad epitelial que presentan estas células, como se analizará a continuación.

### 1.5. Función de las proteínas Sal en el mantenimiento de la integridad epitelial

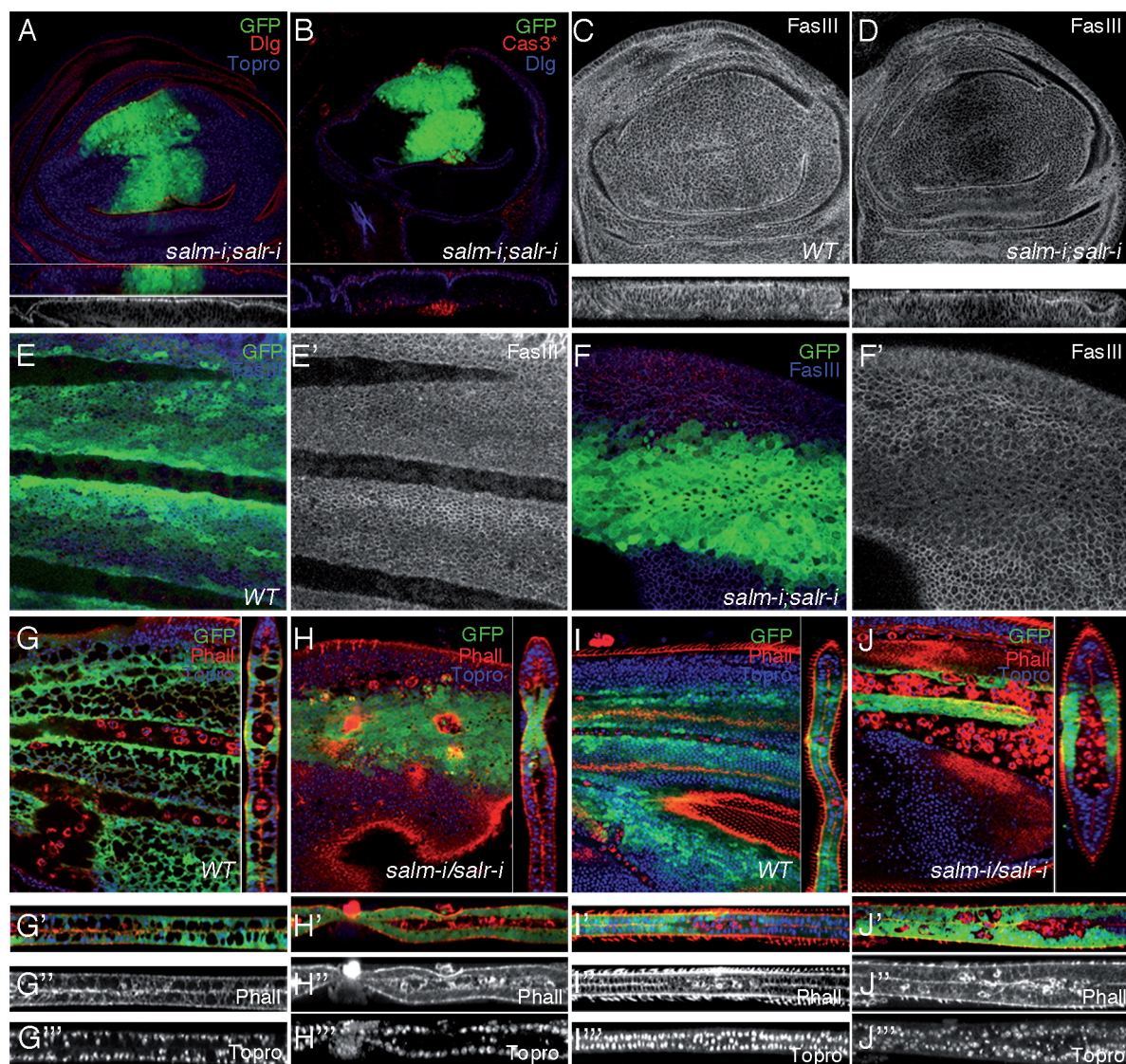
Los clones mutantes para *sal* en la región central del disco imaginal de ala presentan un morfología redondeada, y en sus límites aparecen invaginaciones que separan las células mutantes de las células silvestres (ver Figura 12B, D). Este comportamiento sugiere que las proteínas Sal podrían jugar un papel en la regulación de las afinidades celulares. Para analizar la función de las proteínas Sal en este proceso, hemos estudiado la morfología de discos imaginales de tercer estadio y de alas pupales de 24-30 horas y 36-40 horas APF de genotipo *UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*. Para estudiar la estructura del epitelio hemos visualizado la localización de F-actina (Phalloidina) y la expresión de los marcadores apicales y baso-laterales Disc large (Dlg) y Fasciclina III (FasIII), respectivamente, en secciones transversales del epitelio. En discos *UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* la expresión de Dlg no muestra alteraciones (Figura 20A), y la morfología epitelial parece no estar afectada, aunque en algunos casos observamos la presencia de células localizadas en la parte



**Figura 19. Relación de los genes *sal* con la actividad JNK y la muerte celular.** (A) Ala de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*. (B-B') Expresión en disco imaginal de ala *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/puc-LacZ* de tercer estadio de GFP (verde), Salm (rojo) y puc-LacZ (azul en B y blanco en B'). (C-C') Expresión de Cas3 activada (Cas3\*, rojo en C y blanco en C') y FasIII (verde) en discos imaginales *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 /UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* de tercer estadio. (D) Ala de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 /UAS-salm-i; UAS-salr-i/UAS-puc*. (E-E') Expresión de FasIII (verde) y Cas3 activada (Cas3\*, rojo en E y blanco en E') en discos de este último genotipo. La expresión de Cas3 activada no desaparece al sobre-expresar el regulador negativo de la ruta JNK, Puc (comparar C' con E'), y las alas presentan un fenotipo más fuerte que la falta de *sal* (comparar A con D).

basal del epitelio en el dominio Sal (Figura 20B) y la formación de pequeñas invaginaciones. En estos discos la expresión del marcador baso-lateral FasIII está disminuida en el dominio de expresión de las proteínas Sal (comparar Figura 20C con D). En alas pupales de 36-40 horas APF, la expresión de FasIII sigue disminuida y las células epiteliales presentan una morfología redondeada (comparar Figura 20E' con F'). Al observar alas pupales de 24-30 horas (Figura 20G, H) y de 36-40 horas (Figura 20I, J) vemos que la morfología del epitelio está afectada, llegando incluso a detectar células saliendo del epitelio, como se puede observar por el marcaje de F-actina (Figura 20H, H''). En todos los casos observamos un gran número de células GFP negativas localizadas entre las superficies dorsal y ventral del epitelio del ala que corresponden a hemocitos (Figura 20H, J). Estos datos indican que las proteínas Sal se requieren para mantener la integridad del epitelio en la región central del ala durante el desarrollo del ala, siendo más dramático su requerimiento durante el desarrollo pupal.



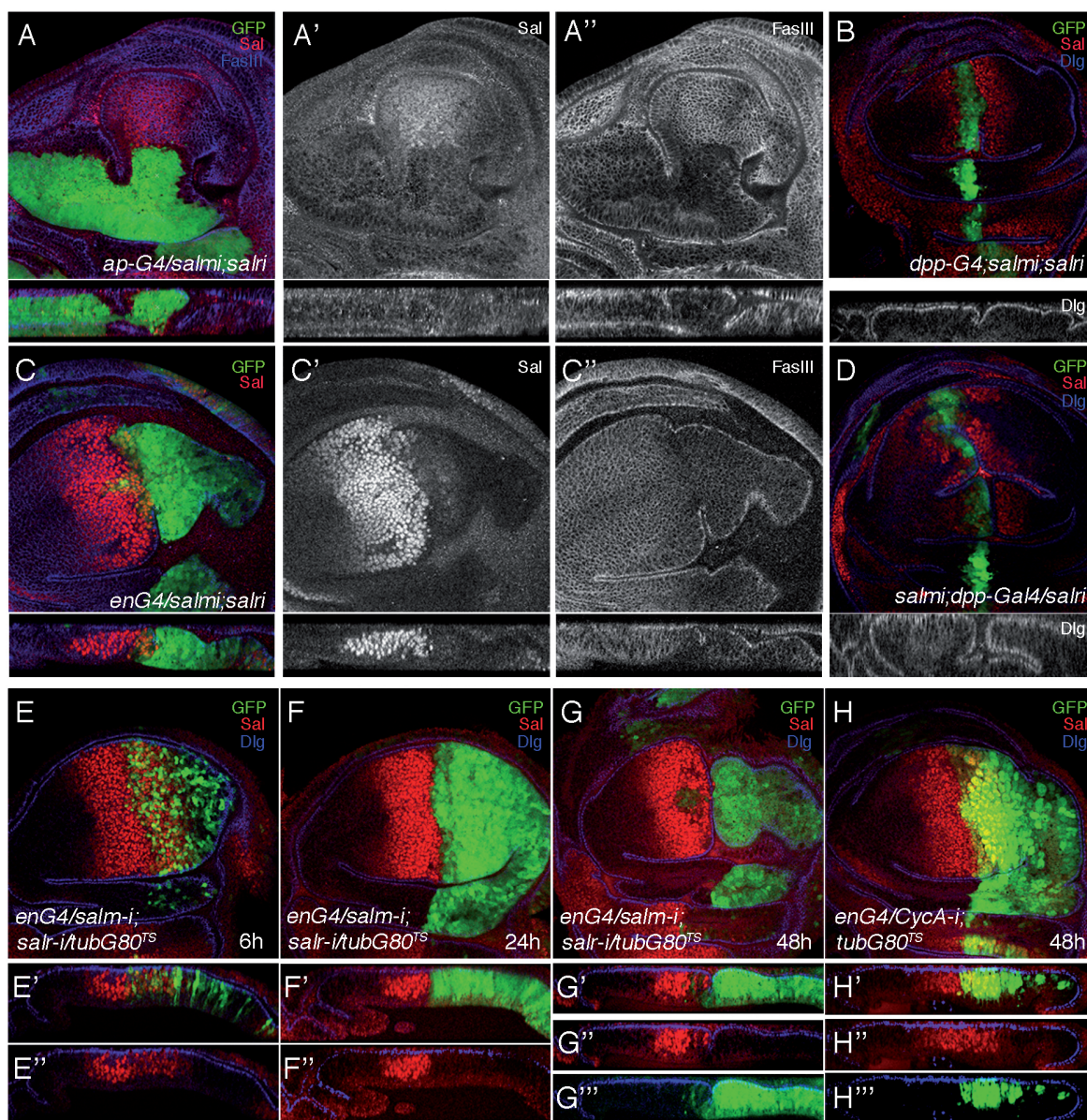


**Figura 20. Efectos celulares de la falta de expresión de *salm* y *salr*.** (A) Expresión de GFP (verde), Dlg (rojo) y Topro (azul) en un disco de tercer estadio de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*. Abajo aparecen las secciones transversales mostrando los tres canales y el canal de Dlg (blanco). (B) Disco de tercer estadio de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* mostrando la expresión de GFP (verde), Cas3 activada (Cas3\*, rojo) y Dlg (azul). Abajo se muestra la sección transversal del disco mostrando los canales rojo y azul. (C-D) Expresión de FasIII en discos de tercer estadio silvestres (C) y *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (D). Hay una reducción de la expresión de FasIII en discos donde la expresión de Sal es reducida. (E-F') Ala pupal silvestre de 36-40 APF (E-E') y ala pupal de la misma edad de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (F-F') mostrando la expresión de GFP (verde) y FasIII (azul en E y F, y blanco en E' y F'). La expresión de FasIII sigue reducida en células mutantes para Sal y éstas presentan un tamaño mayor que las células control. (G-J) Expresión de GFP (verde), Phalloidina (rojo) y topopro (azul) en alas pupales control de genotipo *UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/+* de 24-30 APF (G) y de 36-40 horas APF (I) y alas pupales de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* de 24-30 APF (H) y de 36-40 horas (J). G'-G''', H'-H''', I'-I''' y J'-J''' son las secciones transversales mostrando la expresión de los tres marcadores (G', H', I' y J'), un canal simple con la expresión de Phalloidina (G'', H'', I'' y J'') y Topro (G''', H''', I''' y J'''). Las células del dominio *sal* siguen presentes (marcadas en verde) y el epitelio presenta un fenotipo fuerte de pérdida de integridad (H-H'''). Las células GFP negativas que se observan entre las superficies dorsal y ventral corresponden a hemocitos marcados con Phalloidina (rojo).

Durante el desarrollo imaginal la reducción de los niveles de expresión de *salm* y *salr* en todo su dominio parece no afectar en gran medida a la morfología del epitelio. Sin embargo, cuando se enfrentan en este dominio células que expresan y no expresan *salm/salr* aparecen surcos epiteliales que indican problemas de reconocimiento celular en estos bordes de expresión. Para maximizar la confrontación entre células que expresan y no expresan *salm/salr* utilizamos los genotipos *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*, *en-Gal4-UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* y *UAS-salm-i; dpp-Gal4 UAS-GFP/UAS-salr-i*. En el primer caso la confrontación aparecería a lo largo del borde dorsal-ventral del ala, en el segundo caso a lo largo del borde anterior-posterior y en tercer caso la confrontación de expresión ocurre dentro de su dominio de expresión, en células anteriores al borde anterior-posterior (ver Figura 8). En todos los casos observamos la formación de invaginaciones a lo largo de las regiones de confrontación (Figura 21A-D).

Decidimos analizar la progresión temporal de la formación del surco epitelial en discos *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/tub-Gal80<sup>TS</sup>*. Para ello se crecieron larvas de este genotipo a 17°C, para prevenir la acción de la proteína Gal4, y se pasaron a 29°C al comienzo del tercer estadio larvario. Se observó que la actividad de la proteína Gal4, revelada por la expresión de la proteína GFP, comienza a aparecer a las 6 horas después de la transferencia a 29°C (Figura 21E), en este momento la expresión de la proteína Salm no está muy reducida y el epitelio es normal (Figura 21E''). La expresión de GFP junto con la pérdida de expresión de Salm es clara a las 24 horas después del cambio de temperatura (Figura 21F-F''). En estos discos, el epitelio aún mantiene su continuidad (Figura 21F''). A las 48 horas después del cambio de temperatura ya podemos observar la formación de un surco epitelial (Figura 21G-G'''), observándose una reducción en el tamaño del compartimento posterior. La formación de los surcos no es resultado de una discrepancia entre el tamaño de las células de ambos compartimentos, porque cuando reducimos la proliferación celular en el compartimento posterior en discos *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-CycA-i*, no se observa la formación de un surco entre ambos compartimentos (Figura 21H-H''').



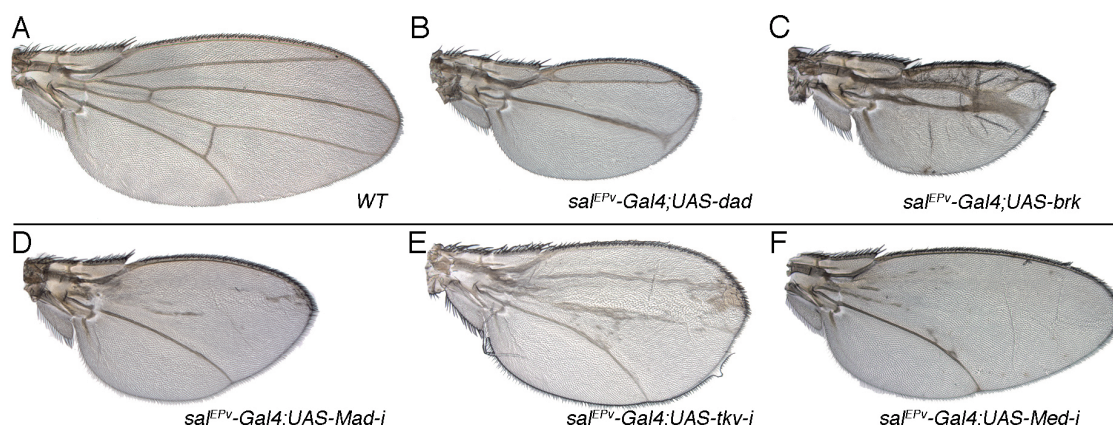


**Figura 21. Efectos de la confrontación entre células que expresan los genes *sal* y células que no los expresan.** (A-A'') Disco de tercer estadio de genotipo *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* mostrando la expresión de GFP (verde), Salm (rojo en A y blanco en A') y FasIII (azul en A y blanco en A''). Abajo de cada panel se muestran las secciones longitudinales de cada disco. (C-C'') Disco de tercer estadio de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* mostrando la expresión de GFP (verde), Salm (rojo en C y blanco en C') y FasIII (azul en C y blanco en C''). Abajo de cada panel se muestran las secciones longitudinales de cada disco. (B-D) Expresión de GFP (verde), Salm (rojo) y Dlg (azul) en discos imaginales de tercer estadio de genotipo *UAS-salm-i/+; dpp-Gal4 UAS-GFP/UAS-salr-i*. Debajo de cada imagen aparecen las secciones longitudinales mostrando el canal de Dlg en blanco. En todos los casos se generan confrontaciones de expresión de *sal* que generan la formación de surcos en el epitelio. (E-F-G) Discos de tercer estadio de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-salm-i; UAS-salr-i/tubGal80<sup>TS</sup>* en una secuencia temporal de activación de la línea Gal4: 6 horas (E), 24 horas (F) y 48 horas (G), mostrando la expresión de GFP (verde), Salm (rojo) y Dlg (azul). La actividad del Gal4, detectada por la expresión de GFP, comienza a aparecer a las 6 horas (E-E') y es robusta a las 24 horas (F-F'). La expresión de Salm está moderadamente reducida a las 6 horas (E'') y desaparece a las 24 horas (F''). En ambos intervalos de tiempo el epitelio es normal (E''-F''). A las 48 horas se observa la formación de un surco epitelial (G-G'') y el tamaño del compartimento posterior aparece reducido (G). (H-H'') Disco imaginal de tercer estadio de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-CycA-i* mostrando la expresión de GFP (verde), Salm (rojo) y Dlg (azul). Aunque la división celular está afectada y las células son más grandes de lo normal, la estructura del epitelio no presenta anomalías.

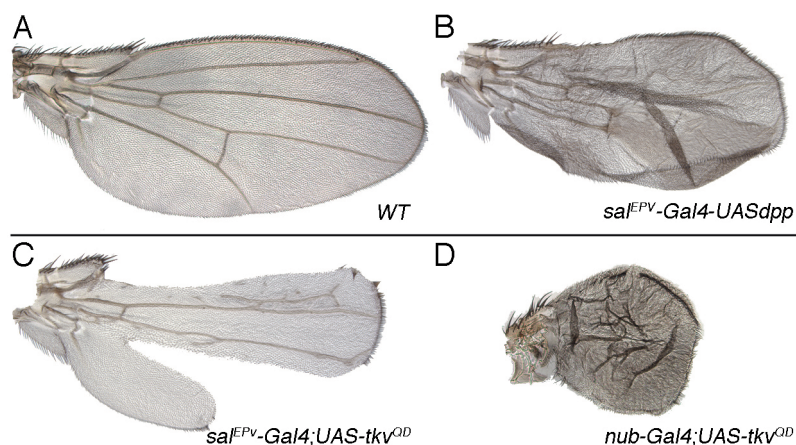
## 2. Relación entre la ruta de señalización Dpp y los genes *sal*

La ruta de señalización Dpp es necesaria para el crecimiento y formación del patrón del ala. Se sabe que esta ruta regula la expresión de los genes *sal* en la región presuntiva del ala (de Celis et al., 1996a). Dado que en este trabajo hemos observado que las proteínas Sal ejercen funciones necesarias para el crecimiento y formación del patrón del ala, funciones que han sido descritas anteriormente para la ruta de señalización Dpp, es posible que éstas proteínas medien algunos aspectos de la función de la ruta Dpp. Para determinar qué funciones de Dpp son mediadas por *sal*, hemos realizado combinaciones genéticas en las que manipulamos simultáneamente la actividad de la ruta y la expresión de los genes *sal*. Como paso previo, hemos analizado los fenotipos de diferentes condiciones de falta y exceso de actividad de la ruta Dpp (Figuras 22 y 23). Como condiciones de falta de Dpp estudiamos tanto el efecto de la sobre-expresión de dos reguladores negativos de la ruta (*brk* y *dad*), como el resultado de la falta de función de los elementos centrales de la ruta (*tkv*, *Mad* y *Med*). En ambos casos utilizamos el sistema Gal4/UAS (Brand and Perrimon, 1993), expresando, bien la forma normal del gen, bien ARNs de interferencia (*UAS-ARN-i*) en combinación con la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* (Figura 8E). Los resultados obtenidos muestran en todos los casos una reducción del tamaño del ala así como diferentes alteraciones en el patrón de venas (Figura 22B-F, comparar con Figura 22A). Para el estudio del exceso de actividad de la ruta Dpp analizamos el efecto de la expresión ectópica de *dpp*, observándose la formación de venas ectópicas (Figura 23B). Por otra parte, la expresión de una versión constitutivamente activada del receptor de la ruta (Tkv<sup>Q253D</sup> (Nellen et al., 1996)) en el centro del ala produce la desaparición de las regiones más anterior y posterior a la zona central del ala (Figura 23C), mientras que su expresión en todo el ala causa la aparición de extravenas y la reducción del tamaño del ala (Figura 23D). Estos datos indican que los requerimientos conocidos de la ruta Dpp se manifiestan utilizando la expresión de ARNs de interferencia, validando su uso para posteriores experimentos.





**Figura 22. Fenotipos de la reducción de la actividad de la ruta Dpp.** (A) Ala silvestre. (B-F) Fenotipos de alas en las que se sobre-expresa los genes *dad* (B) y *brk* (C) o se reduce la expresión de los genes *Mad* (D), *tkv* (E) y *Med* (F), utilizando la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4*. En todos los casos observamos una disminución del tamaño del ala y defectos en la formación del patrón de venas.



**Figura 23. Fenotipos del aumento de actividad de la ruta Dpp.** (A) Ala silvestre. (B-D) Fenotipos de alas en las que se expresa de forma ectópica el gen *dpp* (B) y una forma activada del gen *tkv* (D) utilizando la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* y la línea *nub-Gal4* (D).

## 2.1. Análisis de la participación de las proteínas Sal en la función de Dpp en el ala

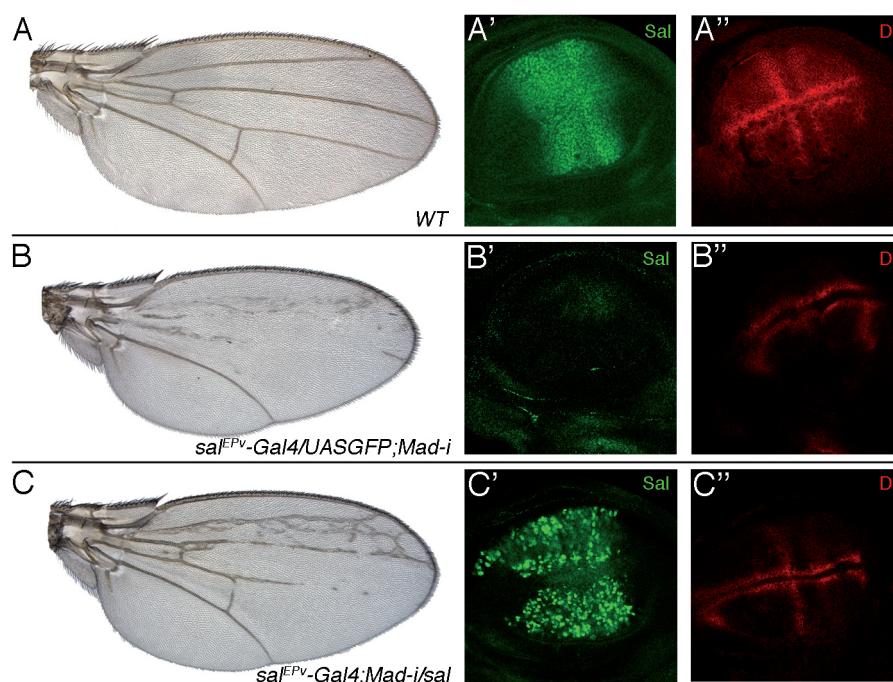
Para entender la participación de las proteínas Sal en la función de Dpp en el ala, se realizaron combinaciones genéticas en las que: 1) se eliminan distintos componentes de la ruta de señalización Dpp y se sobre-expresan las proteínas Sal y 2) se activa la ruta de Dpp en un fondo genético de falta de expresión de las proteínas Sal. En el primer caso identificaremos qué efectos causados por la falta de Dpp son rescatados por la sobre-expresión de las proteínas Sal, y en el segundo caso, qué efectos de la sobre-expresión de Dpp dependen de la presencia de las proteínas Sal.

---

### 2.1.1 Estudio de las consecuencias de la falta de función de la ruta Dpp en combinación con la sobre-expresión de las proteínas Sal

#### 2.1.1.1 Reducción de la expresión de Mad en combinación con la sobre-expresión de Sal

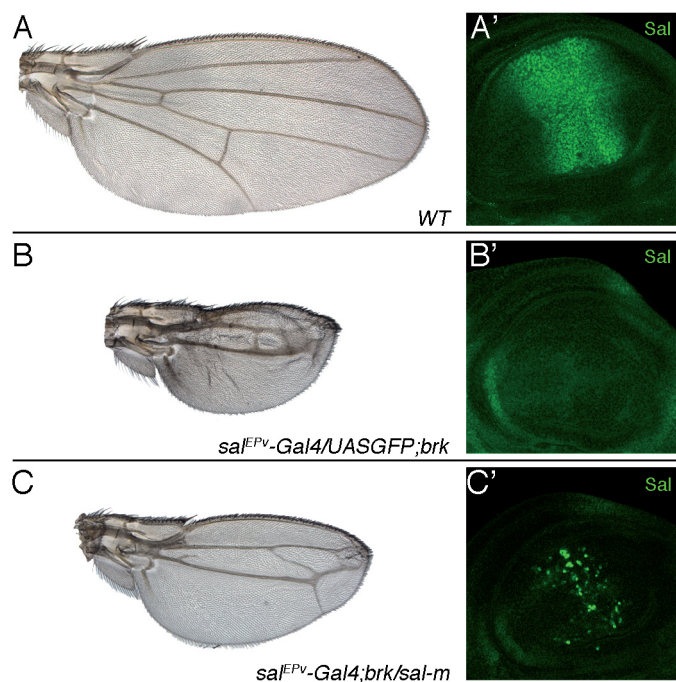
Al reducir la expresión de *Mad*, transductor de la ruta Dpp (ver Figura 6), en el dominio central del ala (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-GFP; UAS-Mad-i*) se observa una reducción del tamaño del ala y la falta de las venas L2, L3 y L4 (Figura 22D y Figura 24B). En los discos imaginales de este genotipo, como es de esperar, se observa una reducción en la expresión de los genes *sal* (Figura 24B', comparar con 24A'). Cuando junto con la disminución de *Mad* expresamos la proteína Salm (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4/ UAS-Mad-i; UAS-salm/+*), se rescata el tamaño del ala y parcialmente la formación de las venas (Figura 24C, comparar con 24B). También se estudiaron los efectos de estos genotipos sobre la expresión del gen *Delta* (DI) en los discos imaginales de ala de tercer estadio. La expresión de DI en discos silvestres se detecta a niveles máximos en las regiones presuntivas de las venas L3, L4 y L5 (Figura 24A''). En discos de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/ UAS-Mad-i* observamos la falta de expresión de DI en la región donde se reducen los niveles de *Mad*, que corresponde a las venas L3 y L4, mientras que los niveles de DI son normales en la vena L5, que queda fuera del dominio de expresión de la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* (Figura 24B''). Observamos que en presencia de Salm se rescata la expresión de DI en las venas L3 y L4 (Figura 24C''). Es de destacar que en estos discos la expresión de Sal (dirigida por la construcción *UAS-salm*) se detecta de manera irregular, con sólo una fracción de células expresando altos niveles de Sal (Figura 24C').



**Figura 24. Rescate de la falta de expresión de *Mad* por *Sal*.** (A) Ala silvestre. (A'-A'') Expresión de *Salm* (verde en A') y *DI* (rojo en A'') en discos de ala de tercer estadio larvario. (B) Ala de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-GFP; UAS-Mad-i/+*, en la que se observa una reducción de tamaño y la pérdida de la mayor parte de las venas L2, L3 y L4. (B'-B'') Expresión de *Salm* (verde en B') y *DI* (rojo en B''). La expresión de *Salm* está reducida y la expresión de *DI* desaparece de la vena L3. (C) Ala de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; UAS-Mad-i/UAS-salm*. Se observa un rescate de la diferenciación de las venas L2, L3 y parte de la vena L4. (C'-C'') Expresión de *Salm* (verde en C') y *DI* (rojo en C''). La expresión de *DI* se rescata en la vena L3.

#### 2.1.1.2 Aumento de la expresión de *Brk* en combinación con la sobre-expresión de *Sal*

Se ha descrito que gran parte de los efectos de *Dpp* en el ala se deben a su regulación negativa sobre el gen *brk* (Cook et al., 2004; Martin et al., 2004; Muller et al., 2003; Schwank and Basler, 2010; Schwank et al., 2008), que codifica para un represor transcripcional (Campbell and Tomlinson, 1999; Jazwinska et al., 1999; Marty et al., 2000; Minami et al., 1999; Sivasankaran et al., 2000). Por ello, estudiamos también el rescate de la sobre-expresión de *Brk* por *Salm* cuando ambos se expresan en la región central del ala. El fenotipo causado por la presencia de *Brk* en este territorio (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-GFP; UAS-brk*) consiste en una reducción del tamaño del ala y en la falta de las venas L2 y L4 (Figura 22C y Figura 25B). En discos de ala de este genotipo observamos una reducción extrema en la expresión de las proteínas *Sal* (Figura 25B'). Al sobre-expresar la proteína *Salm* junto con *Brk* (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; UAS-brk/ UAS-salm*) no observamos un rescate significativo del tamaño del ala y patrón de venas (Figura 25C). En los discos de ala de este genotipo observamos una activación débil e irregular de la expresión de *Salm* (Figura 25C'), indicando que en presencia de niveles altos de *Brk* la línea *Gal4* utilizada (*sal<sup>EPV</sup>*) no se exprese correctamente. La falta de expresión de *Salm* debida a la represión del *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* por *Brk* explicaría por qué no observamos rescate del fenotipo del ala.

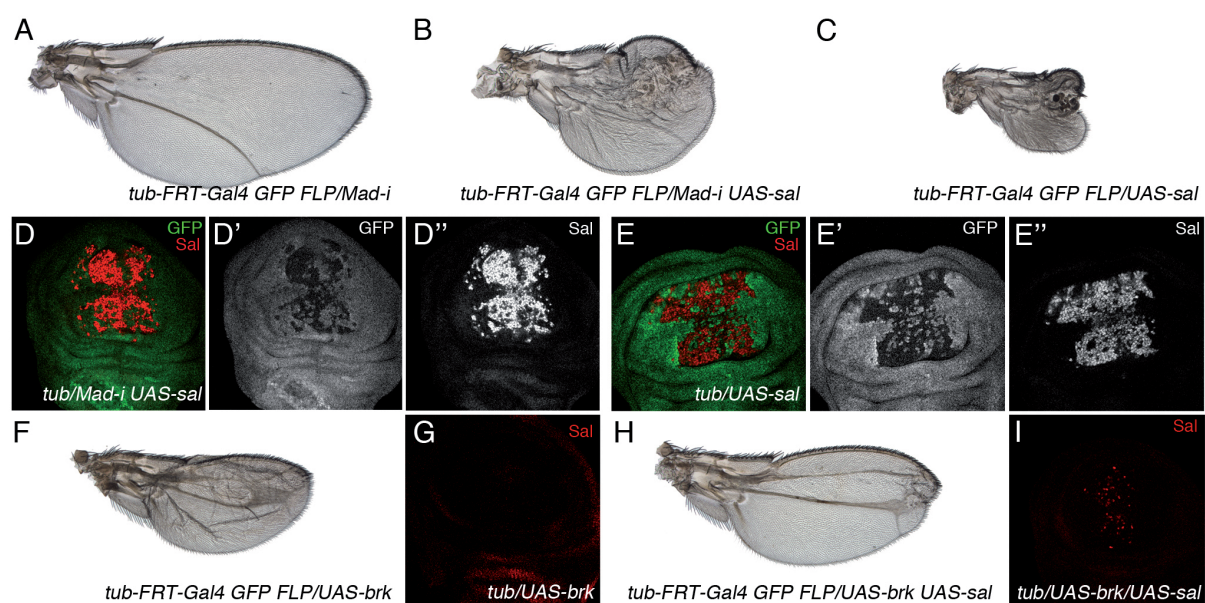


**Figura 25. Rescate de la sobre-expresión de *brk* por Sal.** (A) Ala silvestre. (A') Expresión de Salm (verde) en discos de tercer estadio de genotipo silvestre. (B-B') Alas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-GFP; UAS-brk/+* (B) muestran una reducción del tamaño del ala y la pérdida de las venas L2 y L4. Discos de tercer estadio del mismo genotipo muestran una reducción muy fuerte de la expresión de Salm (verde en B'). (C-C') Fenotipo de alas de *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; UAS-brk/UAS-salm* (C). La sobre-expresión de Salm no rescata las consecuencias de la sobre-expresión de *brk* en la región central del ala. En discos imaginales de tercer estadio la expresión de Salm sólo aparece en algunas células (C'), probablemente por los efectos de Brk sobre la línea Gal4.

Para evitar los efectos negativos de Mad y Brk sobre la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4*, realizamos un experimento en el que esperamos que la expresión de Gal4 se convierta en constitutiva una vez haya sido iniciada utilizando moscas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4; tub FRT-GFP-FRT Gal4 UAS-FLP/UAS-Salm UAS-brk* o *UAS-Mad-i*. En la combinación *sal<sup>EPV</sup>-Gal4; tub FRT-GFP-FRT Gal4 UAS-FLP* la presencia de FLP en el dominio de expresión de la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* induce la eliminación por recombinación de la secuencia *FRT-GFP-FRT*, lo que permite la expresión del Gal4 en estas células dirigido por el promotor de tubulina (*tub-Gal4*) (Figura9). Así, al sobre-expresar únicamente *Mad-i* se observa el mismo fenotipo que observamos en el genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4; UAS-Mad-i* (comparar Figura 26A con Figura 24B), pero al sobre-expresar *salm* y *Mad-i* en este fondo genético no observamos un rescate, sino un fenotipo extremo de reducción del tamaño y extrusión epitelial (Figura 26B). En condiciones de sobre-expresión de *sal* en el fondo genético *sal<sup>EPV</sup>-Gal4; tub FRT-GFP-FRT Gal4 UAS-FLP/UAS-Salm* observamos también alas con un fenotipo extremo de reducción del tamaño y extrusión epitelial (Figura 26C). Este fenotipo podría ser debido a que se generan parches de expresión de Sal, generando confrontaciones entre células que expresan diferentes cantidades de Salm (Figura 26D, E). Cuando sobre-expresamos *brk* observamos un fenotipo similar al encontrado en alas *sal<sup>EPV</sup>-Gal4; UAS-brk* (comparar Figura 26F con Figura 25B), mientras que cuando sobre-expresamos *salm* y *brk* a la vez en este fondo genético no se observa el fenotipo extremo de la sobre-expresión de *salm*, como en el caso en el que se sobre-expresan *salm* y *Mad-i*, si no que se obtiene un fenotipo parecido al observado en moscas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4; UAS-brk /UAS-salm* (comparar Figura 26H con Figura 25C). Esto puede explicarse por la fuerte reducción que genera la sobre-expresión de *brk* sobre la línea Gal4, impidiendo la expresión de *sal* (Figura 26I). El resultado de las confron-



taciones entre células que expresan diferentes niveles de Salm no permite, por tanto, analizar el posible rescate de la falta de Mad o el exceso de Brk por parte de Salm.



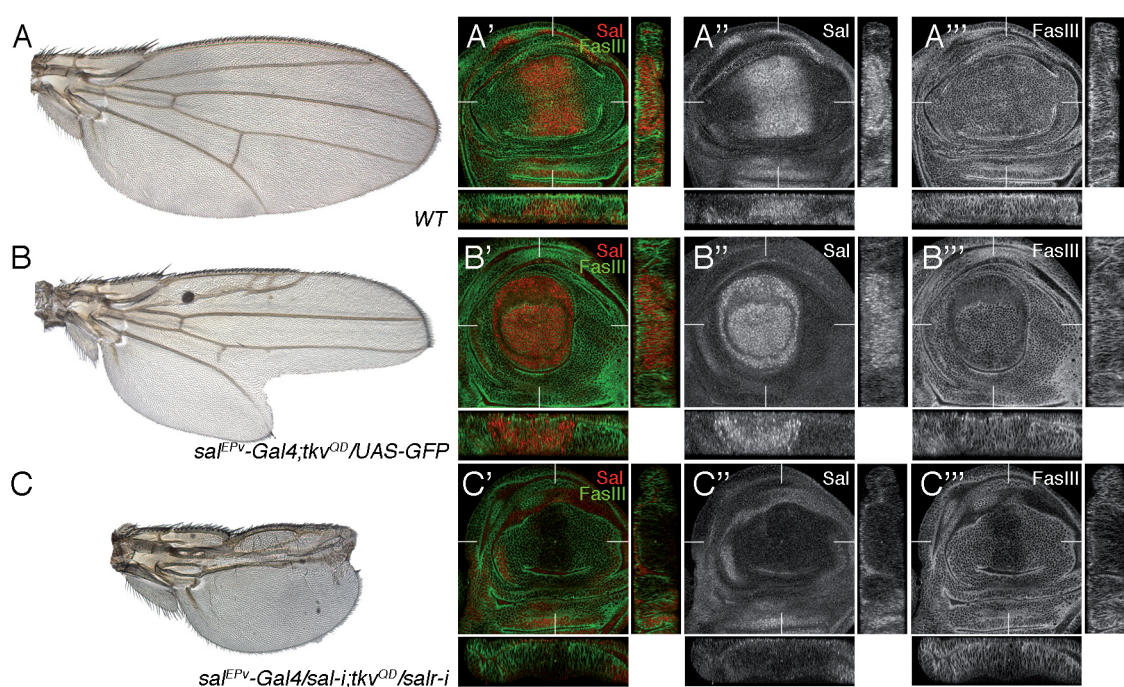
**Figura 26. Manipulación de la expresión de Sal, Brk y Mad dirigidas por el promotor de tubulina.** (A-C) Fenotipo de pérdida de Mad (A), pérdida de Mad y sobre-expresión de Salm (B), y sobre-expresión de Salm (C) en moscas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/ UAS-Mad-i* (A), *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/ UAS-Mad-i UAS-salm* (B) y *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/ UAS-salm* (C). (D-E'') Expresión de GFP (verde en D y E y blanco en D' y E') y Salm (rojo en D y E y blanco en D'' y E'') en discos de tercer estadio de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/ UAS-Mad-i UAS-salm* (D-D'') y *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/ UAS-salm* (E-E''). En ambos casos la expresión de Salm aparece en grupos de células. (F-G) Fenotipo de sobre-expresión de *brk* en moscas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/ UAS-brk* (F). La expresión de Salm en discos de este genotipo desaparece (G). (H-I) Fenotipo de sobre-expresión de *brk* y *salm* en moscas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; tub<FRT-GFP-FRT> Gal4 UAS-FLP/ UAS-brk UAS-salm* (H). La expresión de Salm en discos de este genotipo aparece únicamente en algunas células (I).

## 2.1.2 Estudio de las consecuencias del exceso de función de la ruta Dpp en combinación con la falta de función de las proteínas Sal

Para confirmar la contribución de Sal a la función de la ruta Dpp, estudiamos si los fenotipos causados por una activación constitutiva de la ruta requieren de la presencia de Sal.

### 2.1.2.1 Rescate por Sal de los fenotipos producidos por condiciones de falta y exceso de Tkv

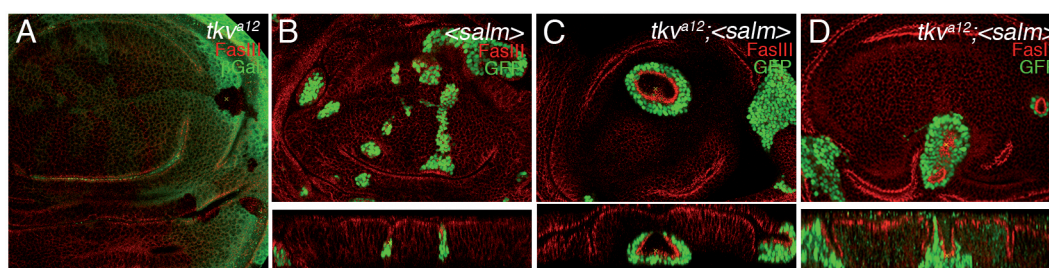
La expresión de una forma activada del receptor Tkv (Tkv<sup>Q253D</sup> (Nellen et al., 1996)) en la región central del ala causa la eliminación de las regiones comprendidas entre la vena L2 y el margen anterior, y entre la intervarena L4-L5 y el margen posterior distal (Figura 23C y Figura 27B). Los discos imaginales de este genotipo (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; UAS-tkv<sup>Q253D</sup>/UAS-GFP*) muestran



57



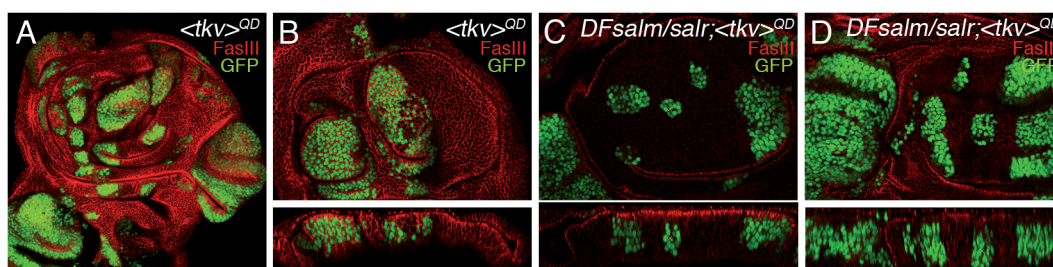
Para analizar el papel de las proteínas Sal en las funciones mediadas por la ruta Dpp, se eliminó la expresión del receptor Tkv en células que sobre-expresan las proteínas Sal. Para ello se generaron clones a 48-72 horas AEL mediante la técnica MARCM (Lee and Luo, 2001). Como control estudiamos clones de falta de función de *tkv* (*tkv<sup>a12</sup>*), identificados por la ausencia del marcador LacZ, inducidos en discos imaginales de tercer estadio de genotipo *y hsFLP1.22/+; FRT40 tkv<sup>a12</sup>/FRT40 P[armlacZ]*. Como era de esperar, las células *tkv<sup>a12</sup>* no crecen en la región central del ala (Burke and Basler, 1996; Rogulja and Irvine, 2005), y sólo aparecen en las regiones laterales del disco de ala (Figura 28A). También como control indujimos clones de sobre-expresión de *salm* en discos de genotipo *y w hsFLP1.22 P[tub-Gal4] UAS-GFP/+; P[tub-Gal80] FRT40A/ UbiGFP FRT40; UAS-salm/+*. Los clones *P[tub-Gal4] UAS-GFP UAS-salm* presentan una morfología redondeada, son pequeños y aparecen rodeados por pequeñas invaginaciones del epitelio (Figura 28B). Los clones *tkv<sup>a12</sup>* que a la vez sobre-expresan Salm se indujeron en discos de genotipo *y w hsFLP1.22 P[tub-Gal4] UASGFP/+; P[tub-Gal80] FRT40A/tkv<sup>a12</sup> FRT40; UAS-salm/+*. Las células *tkv* mutantes que sobre-expresan Salm se identificaron por la presencia de la proteína GFP y se observan tanto en las regiones periféricas como en la región central del ala, indicando que la presencia de Salm rescata la viabilidad de las células *tkv<sup>a12</sup>* (Figura 28C, D). Estos clones presentan todas las características observadas en clones control que sobre-expresan Salm.



**Figura 28. Rescate de la viabilidad de células mutantes para *tkv* por la sobre-expresión de *salm*.** (A) Disco de tercer estadio larvario con clones homocigóticos para el alelo *tkv<sup>a12</sup>*, marcados por la ausencia del marcador  $\beta$ Gal (verde). (B) Clones de sobre-expresión de Salm en discos de tercer estadio larvario marcados por la expresión de la proteína GFP (verde). Abajo se muestra la sección transversal del disco. Los clones son pequeños y causan pequeñas invaginaciones epiteliales. (C-D) Clones de células homocigóticas para el alelo *tkv<sup>a12</sup>* que además sobre-expresan Salm. Los clones se identifican por la expresión de la proteína GFP (verde). La expresión de Salm rescata el defecto en proliferación de *tkv<sup>a12</sup>* en la región central del ala y los clones son redondos y presentan grandes surcos epiteliales. En todos los discos se muestra la expresión de FasIII en rojo.

Como aproximación complementaria, también estudiamos el comportamiento de células que expresan una versión activada del receptor Tkv (*Tkv<sup>Q253D</sup>*) y a las que se han eliminado los genes *sal* (*y w hsFLP1.22 P[tub-Gal4] UASGFP/+; P[tub-Gal80] FRT40A/ Df(2L)32FP5 FRT40; UAS-tkv<sup>Q253D</sup>/+*). Por otro lado observamos que los clones de expresión de *Tkv<sup>Q253D</sup>* (*y w hsFLP1.22 P[tub-Gal4] UASGFP/+; P[tub-Gal80] FRT40A/ ubi-GFP FRT40; UAS-tkv<sup>Q253D</sup>/+*) sobrecrecen en las regiones laterales del ala (Martin et al., 2004), y presentan invaginaciones

epiteliales en la región central del ala (Figura 29A, B), y que los clones de falta de función de *sal* (y *hsFLP1.22/+; FRT40 Df(2L)32FP5/FRT40 P[armlacZ]*), como se vio anteriormente, son de menor tamaño que sus clones hermanos silvestres correspondientes y presentan pequeñas invaginaciones epiteliales en la región central del ala (ver Figura 12). Las células en las que se combina la falta de expresión de los genes *sal* con la expresión del receptor activado, *Dfsal/Tkv<sup>Q253D</sup>*, sobrecrecen en las regiones laterales, comportándose por tanto como las células en las que sólo se expresa *Tkv<sup>Q253D</sup>* (Figura 29C, D). Por otra parte, en la región central del ala estos clones presentan una morfología redondeada, pero ya no presentan invaginaciones epiteliales (Figura 29C, D). Estos resultados indican que las proteínas Sal rescatan las invaginaciones epiteliales producidas por la sobre-expresión del receptor *Tkv<sup>Q253D</sup>* en la región central del ala, pero que no contribuyen a la estimulación del crecimiento producida por la expresión de *Tkv<sup>Q253D</sup>* en las regiones laterales.

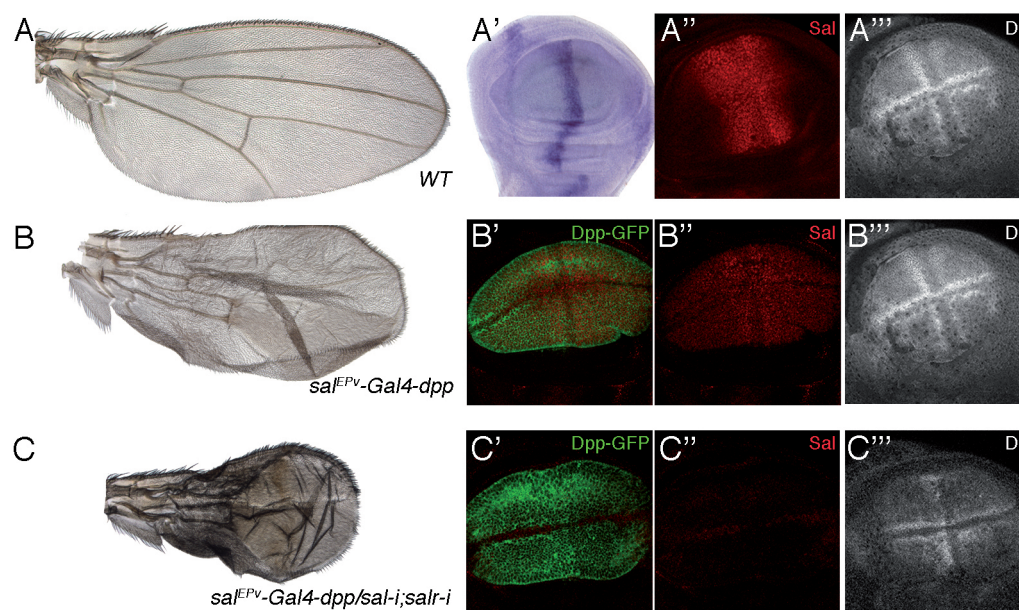


**Figura 29. Clones de expresión de *Tkv<sup>QD</sup>* deficientes para los genes *sal*.** (A-B) Clones de expresión de *Tkv<sup>QD</sup>* en discos de tercer estadio marcados por la proteína GFP (verde). Los discos presentan sobre-crecimientos en las regiones laterales y surcos epiteliales. (C-D) Clones homocigóticos para la deficiencia de *sal*, *Df(2L)32FP5* que expresan *Tkv<sup>QD</sup>* marcados por la proteína GFP (verde). Estos clones siguen presentando sobre-crecimientos en las regiones laterales del disco imaginal, pero el fenotipo de epitelio y crecimiento de los clones localizados en la región central del disco son similares a los clones de falta de *sal* únicamente. En todos los discos se muestra la expresión de FasIII en rojo.

#### 2.1.2.2 Análisis de la sobre-expresión de Dpp en combinación con la reducción de la expresión de *sal*

La sobre-expresión del ligando *dpp* en la región central del ala (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-dpp*) causa la formación de extravenas (Figura 30B). En discos imaginales de este genotipo la expresión de Sal aparece en toda la región de ala (Figura 30B'') y la expresión de Delta no muestra alteraciones (Figura 30B'''), lo que sugiere que las extravenas aparecen durante el desarrollo pupal. La reducción de la expresión de las proteínas Sal en estos individuos (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-dpp/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+*) resulta en alas de menor tamaño que también diferencian extravenas (Figura 30C), a pesar de que la expresión de Delta aparece disminuida en las venas L3 y L4 (Figura 30C'''). De esta forma, parece que las proteínas Sal no contribuyen a la diferenciación de venas inducida por Dpp durante el desarrollo pupal, pero si son necesarias para el

crecimiento inducido por la activación ectópica de Dpp en el ala.



**Figura 30. Relación entre la sobre-expresión de Dpp y la pérdida de expresión de los genes *salm* y *salr*.** (A-A''') Ala silvestre (A) y discos de tercer estadio mostrando la expresión del ARN de *dpp* (A'), Salm (rojo en A'') y de DI (blanco en A'''). (B-B''') Ala de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-dppGFP/+* (B) y discos de tercer estadio del mismo genotipo mostrando la expresión de GFP (verde en B'), Salm (rojo en B' y B'') y DI (blanco en B'''). (C-C''') Expresión de DppGFP (verde en C'), Salm (rojo en C'') y DI (blanco en C''') en discos imaginales de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-dppGFP/ UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*. Alas del mismo genotipo (C), presentan un tamaño reducido y el mismo patrón de venas ectópicas característico de la sobre-expresión de Dpp (mostrado en B).

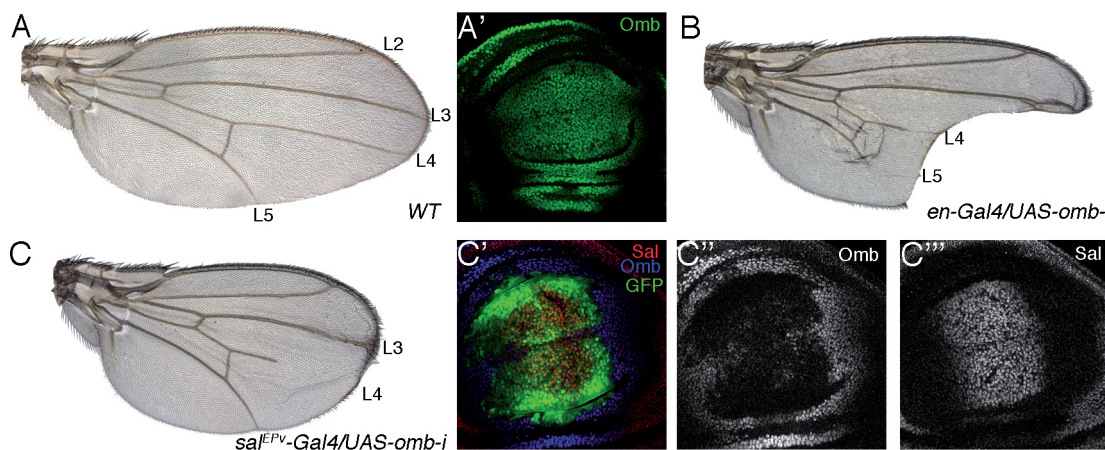
### 3. Relación funcional entre *sal* y *omb*

El gen *optomotor-blind* (*omb*) codifica para un factor de transcripción de la clase T-box, cuya expresión en el ala depende de la señalización de la ruta Dpp (Grimm and Pflugfelder, 1996). *omb* es necesario para un correcto desarrollo del ala, donde participa en la regulación de distintos genes entre los que se incluye *sal* (del Alamo Rodriguez et al., 2004). *omb* también está implicado en regular la estabilidad del borde de compartimento anterior-posterior y en el mantenimiento de la integridad epitelial (Shen et al., 2010; Shen et al., 2008). Dado que *omb* regula la expresión de *sal* y que éste, como se ha indicado anteriormente, está implicado en funciones que también han sido descritas para *omb*, cabría esperar que los efectos de la falta de *omb* en el disco de ala se deban en parte a la falta de expresión de *sal*. Para entender la relación funcional entre estos genes durante el desarrollo del ala, hemos realizado combinaciones genéticas entre variantes en *omb* y *sal*.



### 3.1. Descripción de la interferencia génica del gen *omb*

EL gen *omb* se expresa en toda la región presuntiva del disco de ala (Figura 31A'). La reducción de la expresión de *omb* en discos imaginales de ala de tercer estadio provoca una disminución del tamaño del ala, la falta de la parte más distal de las venas longitudinales L4 y L5, la aparición de órganos sensoriales ectópicos en la parte más distal de la vena L3 y recortes en el margen posterior del ala (Figura 31B, C). La reducción de la expresión de *omb* mediante UAS-ARN-i fue confirmada mediante inmunolocalización de la proteína Omb en discos imaginales de ala (Figura 31C'', comparar con Figura 31A'). En discos de este genotipo la expresión de las proteínas Sal se observa en su dominio normal (Figura 31C'''), lo que sugiere que los fenotipos observados se deben sólo a la pérdida de Omb.

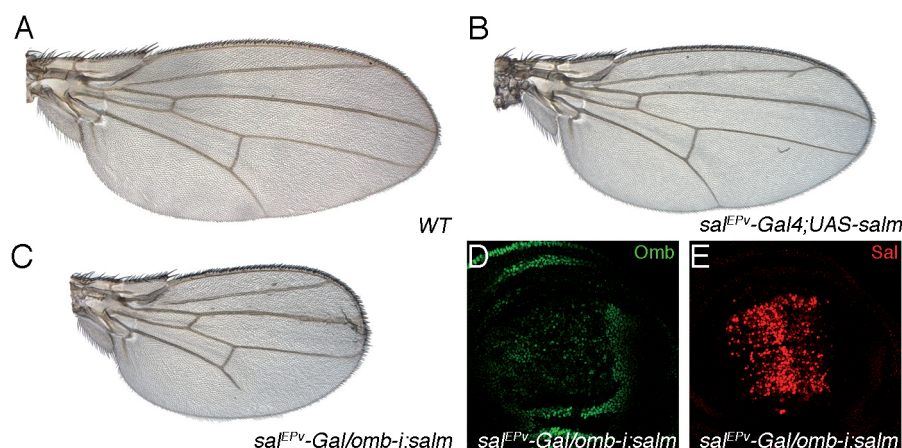


**Figura 31. Descripción de la falta de función del gen *omb*.** (A) Ala silvestre. (A') Expresión de Omb (verde) en un disco imaginal de ala de tercer estadio. (B-C) Fenotipo de pérdida de la expresión del gen *omb* en moscas de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-omb-i* (B) y *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-omb-i* (C). (C'-C''') Expresión de la proteína GFP (verde), Omb (azul en C' y blanco en C'') y de Salm (rojo en C' y blanco en C''') en discos imaginales de ala de tercer estadio de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-omb-i*, la expresión de Omb aparece disminuida en la región central y la de Sal no se ve afectada.

### 3.2. Análisis del efecto de la interferencia génica del gen *omb* en combinación con la sobre-expresión del gen *salm*

Para descartar una contribución de Sal al fenotipo de la combinación *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-omb-i*, sobre-expresamos en estos individuos la proteína Salm. La sobre-expresión de Salm en la región central del ala, donde normalmente se expresa, causa la aparición de venas ectópicas en la región distal de la vena longitudinal L2 (Figura 32B). Al observar alas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-omb-i; UAS-salm/+* no observamos un rescate del fenotipo de *omb-i* (Figura 32C, comparar con Figura 31C). En los discos imaginales de este genotipo la expresión de *omb*

aparece disminuida (Figura 32D) y, como es de esperar, observamos aumentada la expresión de Sal (Figura 32E, comparar con Figura 31C'''). Además, dado que la reducción de *omb* no modifica la expresión de Sal, podemos confirmar que los efectos causados en el desarrollo del ala tras la reducción de la proteína Omb no son llevados a cabo a través de las proteínas Sal.

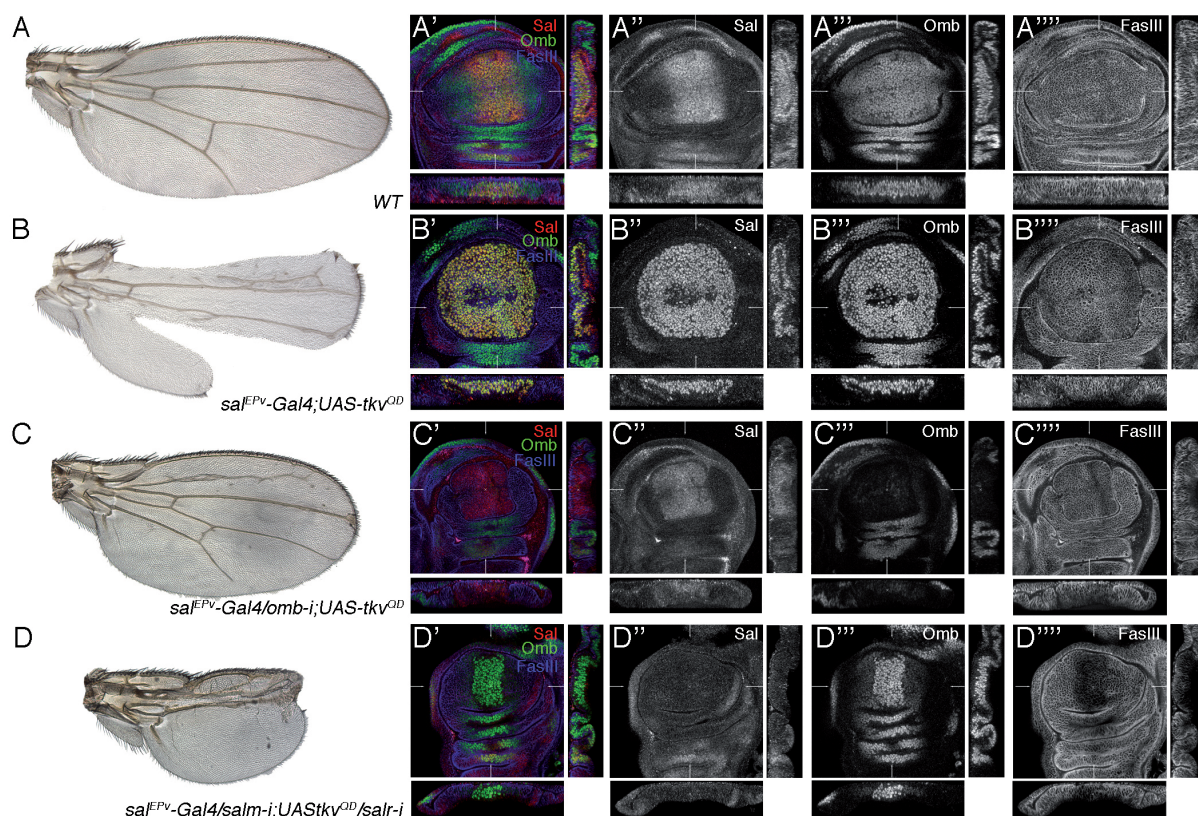


**Figura 32. Relación entre la falta de Omb y la sobre-expresión de Salm.** (A) Ala silvestre. (B) Fenotipo de sobre-expresión de Salm en moscas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4; UAS-salm*. (C-E) Fenotipo de la falta de Omb y sobre-expresión de Salm en moscas de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-omb-i; UAS-salm* (C) y expresión de Omb (verde en D) y Salm (rojo en E) en discos de tercer estadio del mismo genotipo.

### 3.3. Estudio de la interferencia génica del gen *omb* en combinación con una forma activada del receptor Tkv y su relación con los genes *sal*

La expresión de una forma activada del receptor Tkv<sup>Q253D</sup> en la región central del ala, como ya se indicó anteriormente, causa la desaparición de las regiones más anteriores y posteriores a ésta y la formación de surcos epiteliales en los discos imaginales correspondientes. La reducción de los genes *sal* en estos individuos rescata el efecto causado por la expresión de dicha forma activada del receptor (ver Figura 27). La reducción de la expresión de *omb* en individuos donde se expresa la versión activada del receptor Tkv<sup>Q253D</sup> (*sal<sup>EPV</sup>-Gal4/UAS-omb-i; UAS-tkv<sup>Q253D</sup>/+*), muestran alas con el fenotipo característico de la reducción de la expresión de *omb* (Figura 33C comparar con Figura 31C), y los discos imaginales correspondientes presentan una reducción en la formación de surcos epiteliales (Figura 33C', C'''). La expresión de los genes *sal* se encuentra restringida a su dominio normal, aunque los niveles de expresión, comparados con los observados en discos *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/ UAS-tkv<sup>Q253D</sup>*, se encuentran reducidos, posiblemente debido a la reducción de la expresión de *omb* (Figura 33C'', comparar con Figura 33B''). La expresión de *omb* en discos imaginales de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/ UAS-salm-i; UAS-tkv<sup>Q253D</sup>/ UAS-salm-i*, muestra mayores niveles en la región central del ala, debido a la presencia de Tkv<sup>Q253D</sup> (Figura 33D''', comparar con Figura 33B'''). A pesar de este aumento, el tamaño de esta región

continúa disminuido, indicando que esta disminución es debida a la falta de expresión de las proteínas Sal. Por tanto, tras la reducción de Sal o de Omb en discos que expresan  $Tkv^{Q253D}$  se elimina la formación de surcos en el epitelio y la pérdida de las regiones laterales del ala, indicando que los efectos de  $Tkv^{Q253D}$  se producen a través tanto de las proteínas Sal como de la proteína Omb.

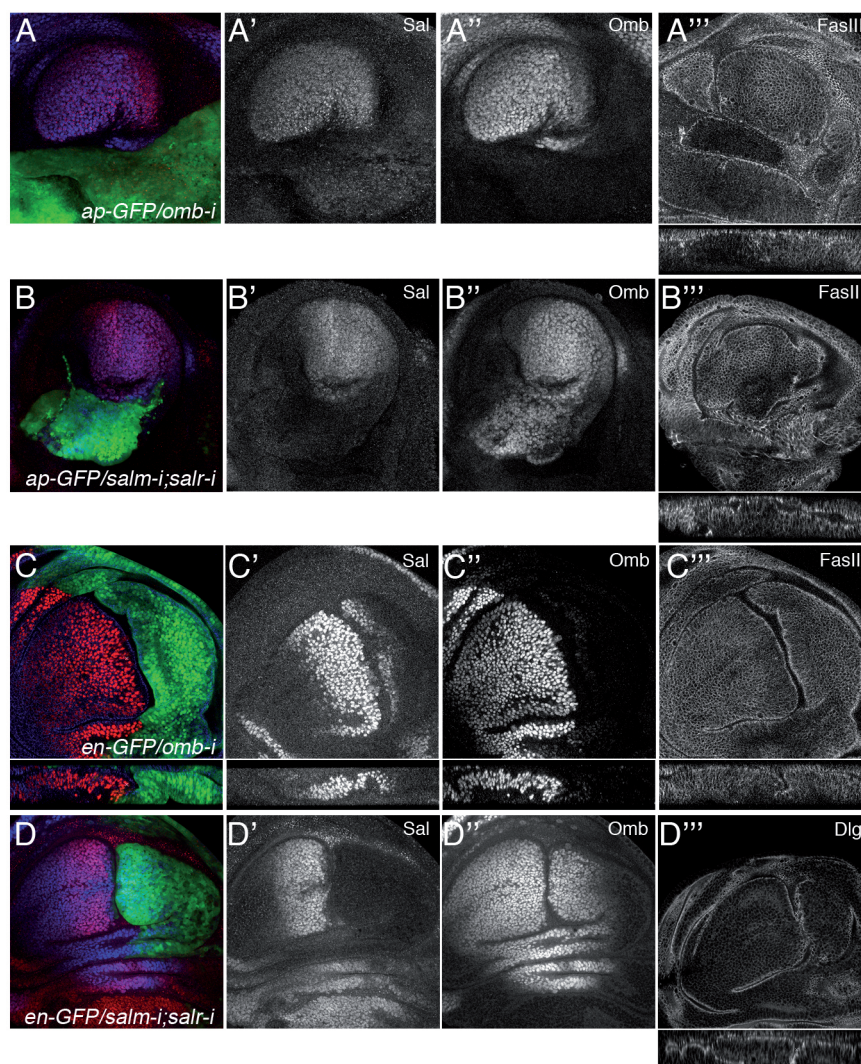


**Figura 33. Relación entre el incremento del receptor Tkv y la pérdida de expresión del gen *omb* y los genes *salm* y *salr*.** (A-A''') Ala silvestre (A) y discos imaginales de tercer estadio mostrando la expresión de Salm (rojo en A' y blanco en A''), de Omb (verde en A' y blanco en A'') y de FasIII (azul en A' y blanco en A''). (B-B''') Ala de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/+; UAS-Tkv<sup>QD</sup>/+* (B) y discos de tercer estadio larvario del mismo genotipo mostrando la expresión de Salm (rojo en B' y blanco en B''), de Omb (verde en B' y blanco en B'') y de FasIII (azul en B' y blanco en B''). (C-C''') Ala de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/omb-i; UAS-Tkv<sup>QD</sup>/+* (C) y discos imaginales de tercer estadio mostrando la expresión de Salm (rojo en C' y blanco en C''), de Omb (verde en C' y blanco en C'') y de FasIII (azul en C' y blanco en C''). (D-D''') Ala de genotipo *sal<sup>EPV</sup>-Gal4/salm-i; UAS-salr-i/UAS-Tkv<sup>QD</sup>* (D) y su correspondiente disco de tercer estadio donde se observa la expresión de Salm (rojo en D' y blanco en D''), de Omb (verde en D' y blanco en D'') y de FasIII (azul en D' y blanco en D''). El fenotipo de este ala y la expresión de FasIII es similar a la observada en alas y discos donde sólo se reduce la expresión de los genes *sal*. Abajo y a la derecha de cada imagen aparecen las secciones transversales y longitudinales de cada disco imaginal. Tanto la falta de *omb* (C) como la de los genes *sal* (D) en condiciones de expresión de *tkv<sup>QD</sup>* presentan un fenotipo similar al observado en alas donde sólo se reduce la expresión de cada uno de ellos por separado.



### 3.4. Relación entre el gen *omb* y los genes *sal* en el mantenimiento de la integridad epitelial

El gen *omb* está implicado en la estabilidad del borde anterior-posterior y el mantenimiento de la integridad epitelial del ala (Shen et al., 2010; Shen et al., 2008), del mismo modo que hemos descrito anteriormente para los genes *sal*. Para analizar si este mantenimiento es llevado a cabo a través de los genes *sal* al ser activada su expresión por *omb* o si ambos están implicados en ello de manera independiente, se generaron confrontaciones de células expresando y no expresando el gen *omb* por un lado y los genes *sal* por otro. En primer lugar la confrontación se generó a lo largo del borde dorsal-ventral del ala utilizando los genotipos *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-omb-i* para el gen *omb* y *ap-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i* para los genes *sal*, y en segundo lugar a lo largo del borde anterior-posterior utilizando los genotipos *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-omb-i* y *en-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i* respectivamente. En ambos casos observamos la formación de invaginaciones a lo largo de las regiones de confrontación (Figura 34A''', B''', C''', D'''). Cuando expresamos *omb-i* observamos una disminución autónoma en sus niveles de expresión (Figura 34A'', C''). Sin embargo, la expresión de *sal* permanece, aunque se detecta a niveles menores que en el compartimento control (Figura 34A', C'). Por su parte, al expresar *salm-i* y *salr-i* se observa que la expresión de *sal* desaparece (Figura 34B', D'), mientras que la expresión de *omb* no varía (Figura 34B'', D''). Estos resultados nos indican que tanto las proteínas Sal como la proteína Omb están implicadas en el mantenimiento de la integridad epitelial, y que participan en este proceso de manera independiente.



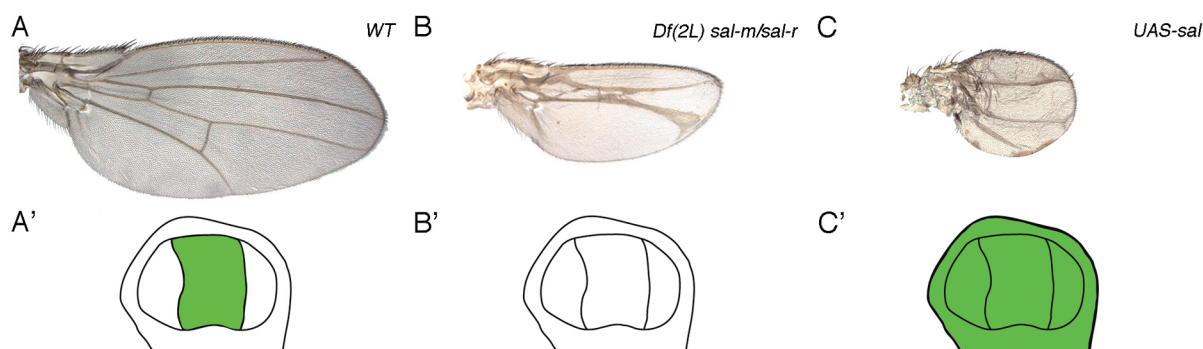
**Figura 34. Efectos de la falta del gen *omb* en el mantenimiento de la integridad epitelial.** (A-A''') Discos imaginales de tercer estadio larvario de genotipo *ap-Gal4 UAS-GFP/ UAS-omb-i* mostrando la expresión de GFP (verde en A), Salm (rojo en A y blanco en A'), Omb (azul en A y blanco en A'') y FasIII (blanco en A'''). (B-B''') Discos imaginales de tercer estadio larvario de genotipo *ap-Gal4 UAS-GFP/ UAS-salm-i; UAS-salr-i* mostrando la expresión de GFP (verde en B), Salm (rojo en B y blanco en B'), Omb (azul en B y blanco en B'') y FasIII (blanco en B'''). (C-C''') Discos imaginales de tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-omb-i* mostrando la expresión de GFP (verde en C), Salm (rojo en C y blanco en C'), Omb (azul en C y blanco en C'') y FasIII (blanco en C'''). (D-D''') Discos imaginales de tercer estadio larvario de genotipo *en-Gal4 UAS-GFP/ UAS-salm-i; UAS-salr-i* mostrando la expresión de GFP (verde en D), Salm (rojo en D y blanco en D'), Omb (azul en D y blanco en D'') y FasIII (blanco en D'''). Debajo de los discos A''', B''', C''' y D''' se muestra la sección transversal de cada uno de ellos. La confrontación de células expresando y no expresando *omb* o los genes *sal* causa defectos en el epitelio.



#### 4. Búsqueda de genes diana de las proteínas Sal y Salm

##### 4.1. Análisis de la expresión génica en individuos con falta o sobre-expresión de las proteínas Sal: microarrays

Debido a la implicación de las proteínas Sal en el control del crecimiento, mantenimiento de la integridad epitelial y formación de patrón de venas en el ala, resulta de gran interés entender cómo estas proteínas ejercen su función así como conocer qué genes son regulados transcripcionalmente por Sal en el disco de ala. Para abordar esta cuestión se emplearon microarrays, lo que nos permitió comparar los perfiles de expresión génica en diferentes condiciones experimentales. De esta manera, para estudiar las alteraciones en el transcriptoma producidas por modificaciones en la expresión de los genes *sal*, realizamos microarrays a partir de discos imaginales de ala en los que los genes *sal* fueron eliminados en las células del ala mediante recombinación mitótica inducida por la enzima Flipasa (*638-Gal4/+; Df(2L)32FP5 FRT40/M(2)z FRT40; UAS-FLP/+*) (Figura 35B, B'), o sobre-expresados por toda el ala mediante el sistema Gal4/UAS (*756-Gal4/UAS-sal*) (Figura 35C, C'). Como individuos control se utilizaron discos imaginales de genotipo *638-Gal4/+; M(2) FRT40/+ ; UAS-FLP/+* y *756-Gal4/+*, respectivamente.



**Figura 35. Fenotipos de falta y sobre-expresión de los genes *sal*.** (A-A') Ala silvestre (A) y esquema de un disco imaginal de tercer estadio representando la expresión de Salm (verde en A'). (B-B') Fenotipo de la deficiencia génica de los genes *sal* (*638-Gal4; Df(2L)32FP5 FRT40/M(2)z FRT40; UAS-FLP/+*) (B) y representación de la falta de expresión de Salm en un esquema de un disco imaginal de tercer estadio del mismo genotipo (delimitada entre líneas en B'). (C-C') Fenotipo de la sobre-expresión de *sal* en todo el ala (*756-Gal4; UAS-salm*) y esquema de un disco imaginal de ala del mismo genotipo donde se representa la expresión de Salm (verde en C').

Para cada uno de estos genotipos se realizaron tres réplicas biológicas en tres microarrays de distinto origen: INDAC (I), Operon (O) y Affymetrix (A), que contienen fragmentos de 300pb representativos de todos los genes de *Drosophila* (I), ADN complementarios a 6000 genes de *Drosophila* (O) y oligonucleótidos de 80pb de todos los genes de *Drosophila* (A). La extracción de los ARNm, síntesis de ADNc e hibridación a los microarrays fueron llevados a cabo por el Dr. Jesús de Celis. El análisis de los datos se realizó con el programa informático

almaZen, (<http://www.jnetdirectbiosciences.com/almazen.htm>). Los genes analizados en los diferentes microarrays primero se ordenaron según la variación en sus niveles de expresión en cada genotipo en comparación con su control correspondiente. Para ello se tomó un “fold change” (variación del nivel de expresión) mayor o igual a  $|1,4|$  y un p-value (probabilidad de que la hibridación de la sonda con el array no sea al azar) de  $10^{-4}$  en el caso de Affymetrix y de  $10^{-2}$  para INDAC y Operon. Los datos obtenidos en las tres plataformas se agruparon en cuatro grupos, correspondientes a los genes que aumentan su expresión en ausencia de Sal (DF+), los que disminuyen su expresión en ausencia de Sal (DF-), los genes que aumentan su expresión al sobre-expresar la proteína Sal (UAS+) y los genes que disminuyen su expresión al sobre-expresar esta proteína (UAS-). En este punto, dado que una medida de “fold change” de  $|1,4|$  es baja y que el número de genes seleccionados fue muy elevado, descartamos aquellos genes cuyo “fold change” se encontraba entre 1,4 y 2 y que sólo aparecían en una plataforma. Finalmente, los microarrays de Affymetrix se analizaron también mediante el software Affymetrix (A\*). Los genes que se seleccionaron tras este análisis fueron aquellos con un “fold change” mayor de 2 y con un p-value de  $10^{-2}$ . Estos genes se añadieron a las listas anteriores para formar un conjunto de 667 genes que es el que serán analizados a continuación. En la Tabla 1 se muestra el conjunto de genes seleccionados.

Para los genes seleccionados realizamos una anotación según las categorías GO (Gene Ontology) de “Molecular Function”, “Cellular Function”, “Molecular Structure” y “Biological Process” utilizando las herramientas informáticas provistas por “FlyMine” (<http://www.flymine.org/>). Se eliminaron del análisis aquellos genes que han sido descatalogados de la última anotación del genoma de *Drosophila* (FlyBase R5.36). Los genes restantes se agruparon en las siguientes clases moleculares utilizando la información GO:

CG: Genes de *Drosophila* sin homologías de secuencias fuera del género *Drosophila* y de función desconocida.

CGh: Genes de *Drosophila* sin ortólogos identificados en otros organismos fuera del género *Drosophila*, y en cuya secuencia se identifica al menos un dominio estructural conservado.

ADN: Genes que codifican proteínas que por su secuencia u otro análisis funcional están relacionadas con el ADN, incluyendo factores de transcripción y proteínas implicadas en la remodelación de la cromatina.

Sig: Genes que codifican proteínas que por su secuencia u otro análisis funcional están relacionadas con rutas y procesos de señalización celular.

CA: Genes que codifican proteínas relacionadas con adhesión celular.

P: Genes que codifican proteínas relacionadas con modificaciones post-traduccionales, tales como procesamiento proteolítico y fosforilación-desfosforilación de proteínas.

M: Genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo energético de la célula.

Cut: Genes que codifican proteínas relacionadas con la formación de cutícula.

ARN: Genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo del ARN.

RedOx: Genes que codifican proteínas implicadas en reacciones de oxidación-reducción en la célula.

Tr: Genes que codifican proteínas relacionadas con el transporte de compuestos a través de membranas.

Cy: Genes que codifican proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto.

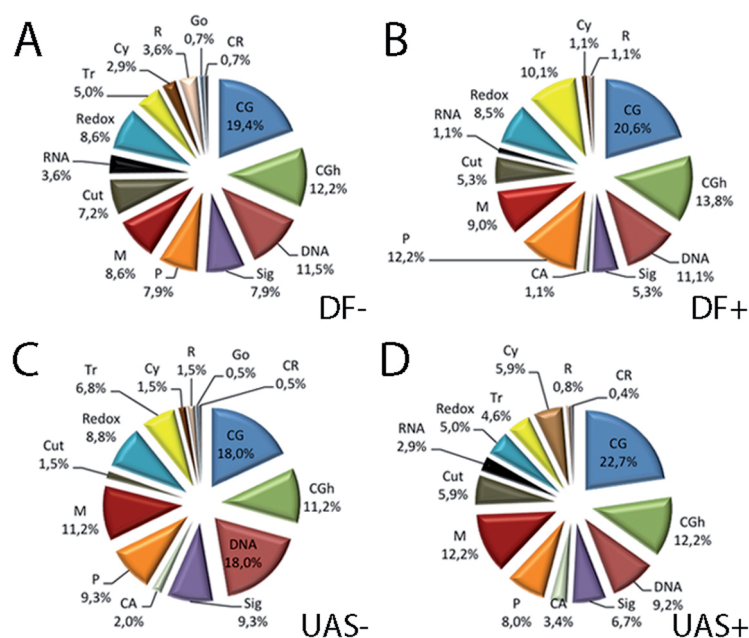
R: Genes que codifican proteínas Ribosomales.

Go: Genes que codifican proteínas relacionadas con el funcionamiento del aparato de Golgi.

CR: ARNs sin pauta de lectura, incluyendo pseudogenes y shRNA.

CD: Genes que codifican proteínas relacionadas con la regulación de la apoptosis.

La agrupación de los 667 genes seleccionados en clases moleculares muestra que éstas están representadas en porcentajes similares en cada condición de expresión de Sal analizada (Figura 36). Observamos que la mayoría de genes seleccionados caen dentro de la clasificación CG. También aparecen un alto número de genes relacionados con funciones metabólicas (M) y de actividad oxidorreductasa (RedOx), y de genes relacionados con regulación transcripcional (ADN), metabolismo de proteínas (P) y señalización celular (Sig).



**Figura 36. Distribución de las clases moleculares de los genes identificados en cada condición de expresión de Sal analizada mediante microarrays.** (A-B) Genes que disminuyen (A, DF-) y aumentan (B, DF+) su expresión en condiciones de falta de Sal. (C-D) Genes que disminuyen (C, UAS-) y aumentan (D, UAS+) su expresión en condiciones de sobre-expresión de Sal. Las categorías de clases moleculares son: CG, proteínas desconocidas; CGh, proteínas con algún dominio estructural conocido; ADN, proteínas relacionadas con el ADN; Sig, proteínas relacionadas con la señalización celular; CA, proteínas relacionadas con adhesión celular; P, proteína relacionada con modificaciones post-traduccionales; M, proteínas relacionadas con metabolismo celular; Cut, proteínas relacionadas con la formación de cutícula; ARN, proteínas relacionadas con el metabolismo del ARN; RedOX, proteínas implicadas en las reacciones de oxidación-reducción en la célula; Tr, proteínas relacionadas con el transporte a través de membranas; Cy, proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto; R, proteínas ribosomales; Go, proteínas relacionadas con el funcionamiento del aparato de Golgi; CR, ARNs sin pauta de lectura y CD, proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis.

con el metabolismo del ARN; RedOX, proteínas implicadas en las reacciones de oxidación-reducción en la célula; Tr, proteínas relacionadas con el transporte a través de membranas; Cy, proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto; R, proteínas ribosomales; Go, proteínas relacionadas con el funcionamiento del aparato de Golgi; CR, ARNs sin pauta de lectura y CD, proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis.

TABLA 1 DF-

Simbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>Ac3</i>	<i>CG1506</i>	O	-1,49	1,44E-02	5,30E+01	M
<i>Ac76E</i>	<i>CG7978</i>	A	-2,36	4,96E-07	1,41E+02	M
<i>Ady43A</i>	<i>CG1851</i>	A	-2,84	4,21E-07	1,96E+02	M
<i>alpha4GT2</i>	<i>CG5878</i>	O	-2,04	2,32E-02	3,70E+01	Go
<i>Arc1</i>	<i>CG12505</i>	A/I	-3,20	1,27E-07	1,66E+03	ADN
<i>Arc2</i>	<i>CG13941</i>	A/O/I	-3,15	8,46E-09	4,99E+02	CGh
<i>CG10962</i>	<i>CG7090</i>	A/I/A*	-2,32	8,28E-06	2,16E+02	RedOx
<i>CG11357</i>	<i>CG11357</i>	A/A*	-2,09	1,79E-08	8,41E+02	P
<i>CG11825</i>	<i>BcADN:RE25483</i>	A	-1,87	1,65E-08	5,40E+01	CG
<i>CG11897</i>	<i>CG11897</i>	I/A	-1,53	4,92E-02	1,61E+01	Tr
<i>CG12129</i>	<i>CG12129</i>	I/O/A/A*	-2,16	8,41E-07	1,51E+02	ARN
<i>CG12269</i>	<i>CG12269</i>	A	-4,12	3,82E-06	4,69E+01	CGh
<i>CG12699</i>	<i>BEST:GH14656</i>	O	-2,43	5,34E-03	3,63E+01	CG
<i>CG13004</i>	<i>CG13004</i>	I	-2,55	6,99E-02	4,33E+00	CG
<i>CG1344</i>	<i>BcADN:LD22679</i>	O	-1,86	1,81E-03	7,62E+01	P
<i>CG13793</i>	<i>CG13793</i>	O	-2,52	3,19E-03	5,06E+01	Tr
<i>CG13829</i>	<i>CG13829</i>	O	-2,41	3,07E-03	1,39E+02	CGh
<i>CG14120</i>	<i>CG14120</i>	O	-1,86	4,05E-04	6,44E+01	ADN
<i>CG14126</i>	<i>CG14126</i>	O	-2,83	2,21E-02	3,88E+01	CG
<i>CG14341</i>	<i>CG14341</i>	O/I	-1,73	2,20E-02	5,25E+01	CG
<i>CG14464</i>	<i>CG40285</i>	I	-2,03	2,09E-05	3,09E+02	CG
<i>CG15116</i>	<i>CG15116</i>	A	-3,43	1,45E-06	2,84E+01	RedOx
<i>CG15117</i>	<i>CG15117</i>	A	-3,05	3,53E-07	2,54E+01	P
<i>CG15212</i>	<i>CG15212</i>	I/O/A*	-2,47	3,95E-02	4,98E+01	CG
<i>CG15236</i>	<i>CG15236</i>	A*	-2,63	1,18E-02	4,93E+00	CG
<i>CG15543</i>	<i>CG15543</i>	O	-1,96	2,65E-02	6,21E+01	M
<i>CG15571</i>	<i>CG15571</i>	O	-2,09	3,09E-04	1,02E+02	CG
<i>CG15675</i>	<i>CG42362</i>	I	-2,86	1,85E-04	2,90E+01	CG
<i>CG15739</i>	<i>CG15739</i>	O	-1,98	2,58E-03	3,11E+01	P
<i>CG15784</i>	<i>CG15784</i>	A/I/O	-2,00	8,72E-10	1,80E+03	CG
<i>CG16756</i>	<i>CG16756</i>	O	-2,01	1,51E-03	1,72E+01	P

TABLA 1 DF- (Continuación)

Simbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
CG16947	CG16947	I	-1,92	2,12E-03	4,78E+01	CGh
CG1698	CG1698	A/I	-1,61	5,93E-06	2,92E+02	Tr
CG17364	CG17364	I	-2,45	4,95E-02	2,12E+01	Cy
CG17374	CG17374	A	-3,82	1,79E-06	8,82E+01	M
CG17622	CG42686	O	-3,81	2,90E-02	2,51E+01	CG
CG18110	CG18110	A*	-4,14	8,81E-04	5,99E+03	Tr
CG18213	CG18213	A/I	-2,06	2,45E-07	6,58E+02	CGh
CG18316	CG18316	O/I/A	-1,60	4,77E-04	3,32E+02	CG
CG18522	CG18522	A/O	-2,46	4,59E-06	1,73E+02	RedOx
CG18643	CG18643	I	-1,90	1,51E-02	2,26E+01	M
CG2909	CG2909	O/I/A	-1,69	7,19E-03	4,75E+01	CG
CG30017	CG30017	A/A*	-7,72	6,75E-07	7,20E+01	CG
CG30069	CG13017	A/O/I	-1,44	2,22E-02	3,36E+03	CG
CG30196	CG30196	I	-2,62	5,47E-04	3,05E+01	Sig
CG30217	CG30217	A/I	-2,21	1,39E-07	3,52E+02	Sig
CG30384	CG11074	O	-2,22	6,74E-04	6,11E+01	CG
CG31098	CG10634	I/A	-1,81	2,92E-03	2,28E+01	P
CG31245	CG3575	I	-2,13	3,87E-03	4,09E+01	CGh
CG31612	CG11631	A*	-1,67	5,61E-02	5,51E+03	CGh
CG31672	CG4248	A/I/A*	-2,03	3,56E-08	1,84E+02	CG
CR43361	CG32021	A/I	-6,37	2,59E-09	1,54E+02	CG
CG32055	CG32055	I/A/A*	-3,62	6,91E-03	2,06E+01	Sig
CG32107	CG32107	I	-2,07	1,24E-03	1,13E+02	CG
CG32241	CG32241	A	-2,12	3,74E-06	8,77E+01	CGh
CG32372	CG7545	A/I/A*	-5,66	5,54E-11	4,18E+02	CGh
CG32412	CG10487	A	-1,48	1,82E-08	4,06E+02	P
CG33205	CG8154	I/A/O	-2,80	4,54E-03	2,27E+01	P
CG34329	CG14189	A	-3,42	4,84E-06	2,61E+01	CG
CG3552	CG3552	I/A	-2,00	4,98E-02	7,82E+00	M
CG3568	CG3568	A*/A/I	-1,06	4,13E-02	7,17E+00	CG
CG4073	CG4073	A	-3,39	4,14E-06	1,61E+01	CG

TABLA 1 DF- (Continuación)

Simbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>CG42319</i>	<i>CG17041</i>	O	-1,86	2,74E-04	2,35E+01	P
<i>CG4409</i>	<i>CG4409</i>	A/I	-1,63	3,19E-06	1,37E+03	CG
<i>CG4749</i>	<i>CG4749</i>	I	-2,87	1,72E-05	1,81E+01	ARN
<i>CG5535</i>	<i>CG5535</i>	I/A	-1,92	3,83E-02	2,27E+01	Tr
<i>CG6055</i>	<i>CG6055</i>	A	-2,40	3,71E-09	5,66E+01	CGh
<i>CG6272</i>	<i>CG6272</i>	A/I	-1,49	2,70E-08	1,95E+03	ADN
<i>CG7420</i>	<i>CG7420</i>	I	-1,99	3,71E-03	2,70E+01	ADN
<i>CG8273</i>	<i>CG8273</i>	I/A	-1,55	6,69E-02	5,04E+00	ARN
<i>CG8675</i>	<i>CG8675</i>	A/I	-1,52	4,56E-04	5,42E+02	CG
<i>CG8965</i>	<i>CG8965</i>	A/A*	-1,93	5,06E-08	2,62E+02	Sig
<i>CG9360</i>	<i>CG9360</i>	A/I	-4,92	8,73E-08	1,59E+01	RedOx
<i>CG9945</i>	<i>CG9945</i>	A	-2,24	3,38E-08	5,53E+02	Cy
<i>CheB53a</i>	<i>CG33457/CG33550</i>	I	-1,94	1,05E-02	1,64E+01	M
<i>Chrac-16</i>	<i>CG15736</i>	A/I	-1,50	2,65E-06	2,54E+03	ADN
<i>Cht7</i>	<i>CG1869</i>	A	-1,51	2,30E-06	1,02E+03	Cut
<i>Clic</i>	<i>CG10997</i>	I	-1,64	7,49E-04	8,75E+01	M
<i>Cp36</i>	<i>CG1478</i>	O	-2,21	6,42E-03	6,29E+01	Cut
<i>Cpr31A</i>	<i>CG4791/CG33302</i>	A*	-1,37	1,56E-02	5,36E+03	Cut
<i>Cpr47Eb</i>	<i>CG13224</i>	A	-2,23	1,71E-10	6,88E+01	Cut
<i>Cpr66D</i>	<i>CG32029</i>	A/I	-1,52	1,68E-07	5,29E+02	Cut
<i>Cpr72Ea</i>	<i>CG4818</i>	O	-1,91	3,81E-02	2,75E+01	Cut
<i>Cpr78E</i>	<i>CG7160</i>	I	-1,98	1,06E-02	8,93E+01	Cut
<i>Cyp4p1</i>	<i>CG10842</i>	A*	-1,80	3,48E-04	5,88E+03	RedOx
<i>Cyp4p2</i>	<i>CG1944</i>	A*	-3,84	4,02E-03	6,76E+03	RedOx
<i>cype</i>	<i>CG14028</i>	I	-2,16	2,21E-04	7,90E+01	RedOx
<i>dlg1</i>	<i>CG1725</i>	O	-1,95	1,32E-02	1,61E+01	Sig
<i>dpr19</i>	<i>CG13140</i>	A*	-1,41	4,03E-04	6,35E+03	CGh
<i>dpr6</i>	<i>CG14162</i>	A	-2,66	1,94E-08	5,59E+01	CGh
<i>GABA-B-R1</i>	<i>CG15274</i>	A	-5,14	5,22E-07	1,87E+01	Sig
<i>gp210</i>	<i>CG7897</i>	A	-13,90	2,81E-06	3,40E+01	Sig
<i>GstE1</i>	<i>CG5164</i>	I/A	-2,86	2,35E-04	2,82E+02	RedOx

TABLA 1 DF- (Continuación)

Simbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>GstE6</i>	CG17530	I/O	-1,57	2,63E-03	1,39E+02	RedOx
<i>His-Ψ:CR31615</i>	CR31615	I	-2,77	4,59E-04	8,34E+01	CR
<i>His4:CG31611</i>	CG31611	I/A	-6,39	8,79E-07	2,14E+02	ADN
<i>l(2)06496</i>	CG9893	A/I	-2,12	4,21E-09	9,46E+02	Cy
<i>l(2)35Bg</i>	CG4180	I/A	-2,79	3,61E-03	2,28E+01	CGh
<i>l(2)efl</i>	CG4533	I	-1,93	9,12E-05	1,57E+02	CG
<i>l(3)S147910/ver</i>	CG14121	O/I	-1,83	4,31E-02	1,03E+02	ADN
<i>Lcp3</i>	CG2043	I	-1,96	2,82E-02	6,05E+01	Cut
<i>lilli</i>	CG8817	I	-3,84	4,18E-02	1,25E+01	ADN
<i>Lsd-2</i>	CG9057	A/I	-1,50	2,70E-06	5,51E+03	M
<i>LSm7</i>	CG13277	O	-39,80	3,39E-05	2,50E+02	ARN
<i>m</i>	CG9369	O	-1,42	6,45E-02	1,57E+01	Cut
<i>miple</i>	CG1221	I/O/A	-1,64	2,04E-04	2,50E+02	Sig
<i>mod(mdg4)</i>	CG32491	I	-1,98	2,99E-05	5,68E+01	ADN
<i>mRpL33</i>	CG3712	I	-1,96	5,11E-04	1,48E+02	R
<i>mRpS17</i>	CG4326	I	-2,07	4,07E-04	7,37E+01	R
<i>Msh6</i>	CG7003	A	-2,54	1,14E-11	1,03E+03	ADN
<i>mthl8</i>	CG32475	A/O/I	-2,13	1,68E-09	3,49E+02	Sig
<i>net</i>	CG11450	A/I	-1,95	1,52E-07	5,24E+02	ADN
<i>Nos</i>	CG6713	A	-2,21	3,15E-06	2,35E+01	ADN
<i>Nuf2</i>	CG8902	I	-3,10	5,34E-04	3,22E+01	Cy
<i>obst-B</i>	CG4778	A/I	-2,22	4,50E-08	1,95E+03	Cut
<i>Osi14</i>	CG1155/Sp558	I/O	-2,19	6,30E-03	6,07E+01	CG
<i>phr6-4</i>	CG2488	A*/I	-1,16	8,79E-02	7,09E+03	ADN
<i>ppk20</i>	CG7577	A*	-6,33	3,72E-06	7,11E+03	Tr
<i>Prx2540-2</i>	CG11765	A/I	-2,88	8,41E-09	2,03E+02	RedOx
<i>Prx5</i>	CG32920/CG7217	I	-1,90	1,50E-05	1,11E+03	RedOx
<i>r2d2</i>	CG7138	I/A	-2,40	2,92E-05	8,56E+01	ARN
<i>Rad1</i>	CG3240	I	-2,55	1,26E-04	8,78E+01	ADN
<i>rpk</i>	CG1058	O/A/I	-1,84	5,65E-02	2,06E+01	Tr
<i>RpL17</i>	CG3203	I/O	-1,83	6,84E-04	1,99E+02	R



TABLA 1 DF- (Continuación)

<b>Símbolo</b>	<b>CG</b>	<b>Plataforma</b>	<b>F. C.</b>	<b>p-value</b>	<b>Av. Signal</b>	<b>Clase Molec.</b>
<i>RpL28</i>	CG12740	I	-1,89	5,56E-04	1,01E+02	R
<i>RpS21/oho23B</i>	CG2986	I	-1,93	4,47E-03	1,69E+04	R
<i>salm</i>	CG6464	A/I/A*	-2,11	3,37E-08	2,31E+03	ADN
<i>salr</i>	CG4881	A/I	-2,25	1,96E-09	5,52E+02	ADN
<i>SCAP</i>	CG33131	A/A*	-2,35	4,34E-10	6,26E+02	P
<i>Snap25</i>	CG40452	I	-2,78	6,84E-05	1,45E+02	CGh
<i>stv</i>	CG32130/CG10745	A	-1,99	5,81E-05	2,38E+03	P
<i>swi2</i>	CG14485	A*	-2,10	2,01E-02	5,21E+03	Sig
<i>Tsp42Ei</i>	CG12843	A*	-1,06	8,28E-04	5,99E+03	CGh
<i>Ugt86Da</i>	CG18578	I	-1,43	2,63E-04	5,31E+01	M
<i>Ugt86Di</i>	CG6658	A/I	-2,48	2,18E-07	1,60E+03	M
<i>unc-13</i>	CG2999	I/O/A	-2,01	6,46E-04	6,67E+01	Sig
<i>vir-1</i>	CG31764	I	-1,98	2,32E-03	3,62E+01	CGh
<i>Wwox</i>	CG7221	I/A	-1,48	1,06E-03	7,92E+01	RedOx
<i>Zasp66</i>	CG6416	I	-1,58	4,12E-02	7,50E+00	CGh

TABLA 1 DF+ (Continuación)

<b>Símbolo</b>	<b>CG</b>	<b>Plataforma</b>	<b>F.C.</b>	<b>p-value</b>	<b>Av. Signal</b>	<b>Clase Molec.</b>
<i>Adh</i>	CG32954/CG3481	O/I	4,90	3,74E-02	1,18E+02	RedOx
<i>agt</i>	CG1303	A*	1,27	1,24E-03	8,20E+03	ADN
<i>amd</i>	CG10501	A*	1,36	3,46E-02	8,13E+03	M
<i>Ance</i>	CG8827	I/A	1,75	3,85E-05	2,43E+03	P
<i>bbc</i>	CG6016	O	1,99	2,49E-02	1,75E+01	M
<i>betaTub97EF</i>	CG4869	I	2,20	4,83E-05	1,97E+02	Sig
<i>br</i>	CG11491	I/O	1,50	2,66E-02	1,98E+02	ADN
<i>CG10200</i>	CG10200	A/I	2,41	3,78E-10	1,62E+03	CG
<i>CG10559</i>	CG10559	A*	1,36	3,40E-04	5,76E+03	CGh
<i>CG10916</i>	CG10916	A*	0,79	4,26E-02	8,51E+03	ADN
<i>CG10932</i>	CG10932	A/I	1,42	9,70E-08	1,58E+03	M
<i>CG11034</i>	CG11034	A	2,70	1,12E-06	8,36E+01	P



TABLA 1 DF+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F.C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
CG11370	CG11370	I	2,31	1,37E-03	1,70E+02	CG
CG12116	CG12116	I	3,86	4,38E-02	2,25E+01	RedOx
CG12182	CG12182	A/I	1,66	3,27E-08	4,33E+02	CGh
CG12310	CG12310	I	4,47	8,45E-03	6,74E+02	CG
CG12519	CG12519	O	3,22	3,65E-02	2,50E+01	CG
CG12560	CG12560	A/A*	4,13	1,83E-08	9,74E+01	M
CG12874	CG34353	I	2,11	2,75E-02	5,03E+01	CG
CG12926	CG12926	O/I	3,81	1,60E-02	1,53E+01	Tr
CG13023	CG13023	I/O	4,98	5,42E-02	3,88E+00	CG
CG13258	CG13258	O	2,04	1,27E-02	8,21E+01	CG
CG13460	CG13460	I	2,19	2,74E-02	6,54E+01	CG
CG14302	CG14302	I	2,65	4,16E-02	4,50E+01	CG
CG14332	CG14332	I	3,80	2,06E-02	2,68E+02	CG
CG14695	CG14695	A*	2,22	1,07E-04	5,94E+03	CGh
CG14869	CG6107	A	3,51	8,34E-07	1,65E+01	P
CG15080	CG15080	A	2,22	2,34E-07	8,07E+01	CG
CG15369	CG15369	O/I	5,71	7,47E-02	2,29E+01	P
CG15404	CG15404	O/I	5,91	8,92E-02	6,73E+01	CG
CG16704	CG16704	I/O	2,60	1,78E-02	5,69E+01	P
CG16712	CG16712	O/I	2,42	2,06E-02	3,71E+01	P
CG16713	CG16713	I/O	4,85	7,32E-03	3,45E+01	P
CG16926	CG16926	I/O	12,44	1,30E-03	1,10E+01	CG
CG17036	CG17036	A*	1,28	1,27E-04	6,07E+03	Tr
CG17244	CG17244	I	2,31	6,52E-03	4,97E+01	CG
CG17270	CG17270	A	2,26	1,13E-07	1,72E+01	CGh
CG17352	CG17352	A/O/I/A*	7,39	2,53E-09	2,64E+02	CGh
CG17838	CG17838	O	2,94	3,42E-03	3,11E+03	ARN
CG18190	CG18190	I	2,19	4,45E-04	1,02E+02	Cy
CG18210	CG18210	O	1,98	1,91E-02	4,16E+01	CG
CG18278	CG18278	A*	1,15	5,68E-04	8,60E+03	M
CG18812	CG18812	I/O	1,72	4,40E-02	1,90E+02	M

TABLA 1 DF+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F.C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
CG2177	CG2177	I/A	2,60	1,12E-06	1,74E+02	Tr
CG2201	CG2201	I/A	1,86	1,56E-03	3,80E+01	P
CG2233	CG2233	I/O	2,77	3,26E-02	6,48E+01	CG
CG2249	VIIc	A/A*	3,76	3,68E-08	5,83E+01	RedOx
CG2444	CG2444	O	2,31	3,15E-02	4,17E+01	CG
CG30359	CG30359	I	2,39	1,26E-02	2,83E+01	M
CG30428	CG30428	A/I	2,66	1,81E-08	3,47E+02	CG
CG31436	CG31436	O/A/I	3,71	5,69E-03	4,21E+01	CGh
CG31451	CG31451	I	2,94	1,05E-05	2,40E+01	CG
CG31559	CG31559	A	1,96	2,15E-10	2,21E+02	RedOx
CG31698	CG31698	I	4,71	8,84E-04	6,71E+01	CG
CG31775	CG31775	I	3,99	7,94E-03	4,78E+02	CG
CG32073	CG32073	I	3,53	2,98E-02	1,93E+01	CG
CG32198	CG32198	I	2,02	3,32E-02	8,56E+01	CG
CG32521	CG32521	I	2,16	5,91E-03	1,54E+01	CG
CG32850	CG32850	A	6,50	3,47E-06	8,13E+02	CGh
CG33156	CG6152/ CG30063	O	5,82	1,12E-02	1,66E+02	M
CG33333	CG33333	I	3,00	2,20E-02	1,62E+02	CG
CG3348	CG3348	I	2,22	1,25E-02	4,55E+01	Cut
CG34360	CG12802	A	2,57	2,89E-07	2,71E+01	CGh
CG3788	CG3788	A*	1,03	2,71E-04	8,17E+03	M
CG4098	CG4098	I/O	1,55	3,80E-02	6,18E+01	M
CG42254	CG12854	A/I/A*	2,59	1,86E-07	1,01E+02	CG
CG42749	CG15786	A/O	1,79	9,06E-06	1,82E+02	CGh
CG4409	CG4409	A*	4,28	1,72E-06	6,64E+03	CG
CG4586	CG4586	O/I	2,00	4,91E-02	2,13E+01	M
CG4928	CG4928	I	2,11	1,69E-04	1,27E+02	CGh
CG5171	CG5171	O/I	1,92	7,58E-02	4,76E+01	M
CG5391	CG5391	A*	1,17	2,04E-04	7,50E+03	CG
CG5758	CG5758	I/A	1,72	9,89E-04	1,53E+02	CGh
CG5830	CG5830	O/I	1,65	3,76E-03	1,18E+02	M

TABLA 1 DF+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F.C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>CG5850</i>	<i>CG5850</i>	A/O	1,45	1,11E-07	1,17E+03	CG
<i>CG5958</i>	<i>CG5958</i>	I	2,97	1,18E-03	1,14E+02	Tr
<i>CG6013</i>	<i>CG6013</i>	O/A	3,27	3,71E-05	9,88E+01	ADN
<i>CG6206</i>	<i>CG6206</i>	A/I	1,70	1,51E-08	4,47E+02	M
<i>CG6357</i>	<i>CG6357</i>	O/A/I	3,32	3,58E-03	4,85E+01	P
<i>CG6568</i>	<i>CG6568</i>	I	1,95	2,77E-02	4,78E+01	CG
<i>CG6701</i>	<i>CG6701</i>	I/A	3,26	1,79E-07	3,17E+01	ADN
<i>CG7080</i>	<i>CG7080</i>	A*	1,44	2,83E-02	6,30E+03	CG
<i>CG7465</i>	<i>CG7465</i>	I	4,03	2,71E-02	4,58E+01	CGh
<i>CG7470</i>	<i>CG7470</i>	O/I	2,29	3,49E-02	1,51E+01	RedOx
<i>CG7587</i>	<i>CG7587</i>	I	6,27	1,48E-04	2,09E+02	CG
<i>CG7720</i>	<i>CG7720</i>	A/I	1,88	6,44E-09	5,68E+02	Tr
<i>CG7906</i>	<i>CG7906</i>	A	3,26	7,39E-06	2,60E+01	P
<i>CG8451</i>	<i>CG8451</i>	O/A	1,80	8,58E-02	3,98E+00	Tr
<i>CG8503</i>	<i>CG8503</i>	O/I	1,60	5,32E-02	3,55E+01	ADN
<i>CG8945</i>	<i>CG8945</i>	A*	1,95	1,69E-04	5,05E+03	P
<i>CG9040</i>	<i>CG9040</i>	I	4,60	2,67E-02	2,60E+01	CG
<i>CG9629</i>	<i>CG9629</i>	A	2,09	1,59E-07	5,24E+01	RedOx
<i>CG9686</i>	<i>CG9686</i>	A	3,72	4,41E-07	2,89E+01	CG
<i>CG9766</i>	<i>CG9766</i>	A	2,14	5,69E-06	1,04E+02	CGh
<i>CG9850</i>	<i>CG11169</i>	A*	1,26	3,11E-04	8,46E+00	P
<i>Clect27</i>	<i>CG3244</i>	A*	1,38	5,34E-04	8,56E+03	CGh
<i>Cpr49Ac</i>	<i>CG8502</i>	A/I	1,68	7,54E-06	3,60E+03	Cut
<i>Cpr67Fa2</i>	<i>CG18349</i>	A*	1,48	1,03E-04	5,75E+03	CG
<i>CRMP</i>	<i>CG1411</i>	A/I	2,00	3,01E-07	2,67E+02	M
<i>Cyp4d1</i>	<i>CG3656</i>	I	8,08	3,74E-03	2,40E+01	RedOx
<i>Cyp6a17</i>	<i>CG10241</i>	A/I	2,23	1,27E-07	3,01E+02	RedOx
<i>Cyp6g1</i>	<i>CG8453</i>	I	2,77	4,77E-02	5,67E+00	RedOx
<i>E23</i>	<i>CG3327</i>	A/I	2,56	2,83E-08	2,36E+02	Tr
<i>EG:103E12.2</i>	<i>CG14629</i>	I	3,30	5,10E-03	1,65E+01	CG
<i>Eig71Ee</i>	<i>CG7604</i>	I	3,83	3,13E-03	1,58E+03	Cut

TABLA 1 DF+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F.C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>Fbp1</i>	CG17285	I/O	4,45	3,81E-05	1,23E+03	Tr
<i>Fbp2</i>	CG3763	I	5,32	1,22E-03	2,04E+02	RedOx
<i>fok</i>	CG10746	A	1,97	8,51E-09	1,23E+03	CG
<i>fon</i>	CG15825	I/O	5,07	2,86E-04	2,72E+02	CGh
<i>fs(1)Yb</i>	CG2706	A*	3,66	3,54E-02	6,08E+03	ADN
<i>Gbeta5</i>	CG10763	A*	1,06	7,57E-04	5,02E+03	CGh
<i>gkt</i>	CG8825	A/I	1,70	4,85E-06	3,05E+02	CGh
<i>Gld</i>	CG1152	A/I	1,65	6,74E-08	5,39E+02	RedOx
<i>Gs1l</i>	CG15441	A*	1,50	9,59E-04	6,78E+03	M
<i>GstE5</i>	CG17527	A*	2,24	1,99E-03	6,96E+03	RedOx
<i>GstE6</i>	CG17530	A*	3,58	6,62E-08	7,35E+03	RedOx
<i>His1:CG31617</i>	CG31617	I/A	2,26	6,48E-04	6,58E+01	ADN
<i>Hn</i>	CG7399	I	2,99	6,46E-04	4,28E+01	RedOx
<i>Hsp26</i>	CG4183	I	2,03	8,45E-03	6,69E+01	P
<i>Idgf4</i>	CG1780	I/O	2,70	5,12E-06	4,94E+02	Sig
<i>ImpE1</i>	CG32356	A/I	2,08	5,90E-06	2,62E+03	CGh
<i>ine</i>	CG15444	A*	1,02	1,06E-03	5,62E+00	Tr
<i>l(1)G0469</i>	CG32597	I/O	1,58	2,30E-02	8,71E+01	CG
<i>l(2)01810</i>	CG5304	I	2,22	3,66E-03	6,10E+01	Tr
<i>l(2)03659</i>	CG8799	A*	1,39	1,73E-05	6,74E+03	Tr
<i>l(2)35Bg</i>	CG4180	A*	1,03	7,05E-03	7,65E+03	CGh
<i>l(3)87Df</i>	CG7620	A/I/A*	1,68	1,61E-07	1,23E+03	CGh
<i>l(3)S147910/ver</i>	CG14121	A*	1,17	1,14E-05	7,52E+03	ADN
<i>Lsd-1</i>	CG10374	I	2,81	3,31E-02	3,46E+01	CGh
<i>Lsp1alpha</i>	CG2559	I/O	6,61	1,66E-05	1,95E+02	Tr
<i>Lsp1beta</i>	CG4178	I/O	7,19	9,85E-04	1,04E+03	Tr
<i>Lsp1gamma</i>	CG6821	I	3,88	7,48E-05	7,83E+02	Tr
<i>Lsp2</i>	CG6806	I	4,61	1,34E-04	5,82E+02	Tr
<i>mbi</i>	CG33197	A/I	2,69	4,25E-07	3,31E+02	ADN
<i>mre11</i>	CG16928	A*	0,83	3,54E-02	9,47E+03	ADN
<i>mthl4</i>	CG6536	A/I/A*	2,06	4,43E-07	5,10E+02	Sig

TABLA 1 DF+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F.C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>mus205</i>	CG1925	A*	1,03	1,09E-02	8,39E+03	ADN
<i>nemy</i>	CG8776	I	2,04	1,45E-02	4,26E+01	RedOx
<i>nimB2</i>	CG31839	I	2,96	3,43E-03	2,69E+01	Sig
<i>ntc</i>	CG10855	A/I	1,91	1,12E-06	1,10E+02	P
<i>Obp56d</i>	CG11218	I	4,12	5,84E-03	8,61E+02	Sig
<i>Obp99b</i>	CG7592	I	5,21	5,94E-04	6,87E+02	Sig
<i>Obp99c</i>	CG7584	I	5,94	3,03E-03	1,75E+01	Sig
<i>Optix</i>	CG18455	A/O/I	1,76	8,18E-07	3,70E+02	ADN
<i>Orct</i>	CG6331	I/O	2,97	6,76E-04	2,15E+01	Tr
<i>Oseg5</i>	CG9333	A/A*	13,81	3,78E-06	4,46E+01	Cy
<i>PGRP-LC</i>	CG4432	A/I/A*	4,59	8,11E-07	8,47E+01	ADN
<i>phr</i>	CG11205	A	2,22	2,46E-13	1,25E+03	ADN
<i>pinta</i>	CG13848	I/A	3,74	3,40E-04	2,26E+01	M
<i>pio</i>	CG3541	I	2,44	6,02E-05	2,06E+02	Cut
<i>pnt</i>	CG17077	O/A	2,43	1,02E-02	1,81E+01	ADN
<i>Ptpa</i>	CG3289	O	2,30	7,19E-04	7,33E+01	Sig
<i>RanBP3</i>	CG10225	I	2,06	1,67E-03	4,15E+01	Sig
<i>rec</i>	CG31293	I	1,94	7,38E-04	1,38E+02	ADN
<i>RfaBp</i>	CG11064	I	10,70	4,73E-03	3,36E+01	Tr
<i>RpL27</i>	CG4759	I	2,36	1,27E-04	3,66E+02	R
<i>RpS11</i>	CG8857	A*	1,35	6,58E-04	9,78E+03	R
<i>Rpt3R</i>	CG9475	A/I/A*	1,72	1,87E-06	2,87E+02	P
<i>ry</i>	CG7642	A/I/A*	2,57	1,69E-06	4,01E+02	RedOx
<i>sage</i>	CG12952	I	2,20	5,13E-03	3,80E+01	ADN
<i>sala</i>	CG4922	A/O/I/A*	84,83	3,04E-13	2,26E+02	CG
<i>Sgs1</i>	CG3047	I	4,52	1,29E-02	4,48E+01	Cut
<i>Sgs3</i>	CG11720	O/I	4,03	7,56E-02	1,33E+03	Cut
<i>Sgs4</i>	CG12181	I	7,51	1,95E-02	7,43E+02	Cut
<i>Sgs5</i>	CG7596	I	7,99	2,22E-02	1,75E+02	Cut
<i>Sgs7</i>	CG18087	I	7,59	7,15E-03	1,83E+03	Cut
<i>Sgs8</i>	CG6132	I	7,50	7,72E-03	4,07E+02	Cut

TABLA 1 DF+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F.C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>slow</i>	CG7447	A/O	1,46	1,53E-09	6,37E+02	CA
<i>Snap25</i>	CG40452	A*	2,79	2,75E-02	6,80E+03	CGh
<i>Sox14</i>	CG3090	I	1,90	4,05E-04	1,88E+01	ADN
<i>SoxN</i>	CG18024	O/I	2,52	5,43E-02	5,35E+00	ADN
<i>SP1029</i>	CG11956	I/O	1,60	1,83E-03	6,27E+01	P
<i>SPE</i>	CG16705	A	2,61	3,29E-09	7,17E+01	P
<i>spirit</i>	CG2056	A	2,25	7,65E-06	9,33E+01	P
<i>spn-E</i>	CG3158	I/A*	2,45	4,09E-02	7,94E+00	ARN
<i>Spn100A</i>	CG1342	A	2,53	9,57E-06	5,50E+02	P
<i>Spn28D</i>	CG7219	A/I	2,01	1,46E-11	6,81E+02	P
<i>Spn42De</i>	CG9460	A/A*	2,85	7,86E-09	2,02E+02	P
<i>Spn43Ab</i>	CG1865	I/O	2,00	2,20E-02	2,55E+01	P
<i>spz</i>	CG6134	I/O	2,04	1,15E-02	1,20E+01	Sig
<i>Strn-Mlck</i>	CG18255	I	2,32	2,86E-03	5,46E+01	P
<i>SytIV</i>	CG10047	A/I	28,91	3,65E-12	1,60E+02	Tr
<i>Tig</i>	CG11527	O	2,15	6,95E-02	8,63E+01	CA
<i>TotA</i>	CG31509	I	1,91	2,02E-02	2,58E+01	M
<i>Tsf1</i>	CG6186	I	2,64	4,24E-03	2,22E+02	Tr
<i>Tsp26A</i>	CG9093	A/I	1,97	2,31E-06	6,68E+01	CGh
<i>Tsp42Ej</i>	CG12143	A/I	4,96	1,11E-06	4,49E+01	CGh
<i>Tsp42Ek</i>	CG12841	I	2,73	6,95E-03	2,45E+01	CGh
<i>yellow-c</i>	CG4182	A	2,69	3,44E-08	2,51E+02	CGh

TABLA 1 UAS- (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>Ac76E</i>	<i>CG7978</i>	A/A*	-4,00	7,50E-06	2,72E+01	M
<i>agt</i>	<i>CG1303</i>	A*	-1,80	1,42E-02	8,44E+03	ADN
<i>Ama</i>	<i>CG2198</i>	A/I/O	-1,86	9,42E-08	4,66E+03	CA
<i>ana</i>	<i>CG8084</i>	A/I/O/A*	-4,74	3,23E-08	1,02E+03	Sig
<i>Arc1</i>	<i>CG12505</i>	A*	-2,49	6,82E-03	1,15E+01	ADN
<i>Arc2</i>	<i>CG13941</i>	A*	-2,49	2,29E-02	7,96E+03	CGh
<i>BM-40-SPARC</i>	<i>G6378</i>	I	-1,90	7,59E-06	1,96E+02	CA
<i>Brd</i>	<i>CG3096</i>	I/O/A/A*	-3,28	1,26E-04	3,75E+02	Sig
<i>cer</i>	<i>CG10460</i>	O/I/A	-1,91	3,56E-04	9,87E+02	P
<i>cerv</i>	<i>CG15645</i>	A	-2,51	9,89E-08	1,54E+02	CG
<i>CG10102</i>	<i>CR10102/Arc3</i>	A*	-2,73	1,25E-02	9,98E+03	CR
<i>CG10311</i>	<i>CG10311</i>	I/O/A*	-3,82	3,15E-04	3,18E+01	CG
<i>CG10863</i>	<i>CG10863</i>	A*	-1,11	1,02E-04	7,77E+03	RedOx
<i>CG10916</i>	<i>CG10916</i>	A*	-0,68	2,56E-02	8,67E+00	ADN
<i>CG11007</i>	<i>CG11007</i>	I	-2,31	3,33E-03	2,73E+01	RedOx
<i>CG11261</i>	<i>CG11261</i>	I/A	-2,04	4,34E-03	3,27E+01	P
<i>CG11883</i>	<i>CG11883</i>	A*	-1,43	7,06E-02	5,98E+03	ADN
<i>CG11897</i>	<i>CG11897</i>	A*	-1,67	6,29E-02	8,21E+03	Tr
<i>CG12481</i>	<i>CG12481</i>	A*	-1,12	1,02E-04	6,15E+03	CG
<i>CG12582</i>	<i>CG12582</i>	I/A	-1,74	4,80E-04	1,50E+02	M
<i>CG12868</i>	<i>CG12868</i>	A*	-1,47	5,73E-02	7,88E+03	CG
<i>CG13023</i>	<i>CG13023</i>	O/A*	-2,18	5,17E-02	9,43E+01	CG
<i>CG13643</i>	<i>CG13643</i>	A	-1,90	1,33E-06	4,00E+01	Cut
<i>CG14636</i>	<i>CG14636</i>	A/O/A*	-6,36	7,16E-06	6,62E+01	CG
<i>CG14695</i>	<i>CG14695</i>	A*	-2,43	4,37E-04	6,42E+03	CGh
<i>CG14935</i>	<i>CG14935</i>	A*	-2,56	5,22E-03	6,74E+03	M
<i>CG15173</i>	<i>CG15173</i>	A*	-1,02	2,99E-03	7,20E+03	CGh
<i>CG15212</i>	<i>CG15212</i>	I/O/A	-2,80	4,71E-05	9,99E+02	CG
<i>CG15282</i>	<i>CG15282</i>	A/I/A*	-6,97	1,16E-07	4,58E+02	CG
<i>CG15571</i>	<i>CG15571</i>	O	-1,90	7,40E-05	6,43E+01	CG
<i>CG15765</i>	<i>CG15765</i>	A/O	-2,59	4,48E-08	2,57E+01	CGh

TABLA 1 UAS- (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
CG15784	CG15784	A*	-2,37	6,72E-04	9,67E+00	CG
CG15785	CG42749	I	-2,36	1,61E-03	3,17E+01	CGh
CG15890	CG15890	A	-1,94	3,64E-10	2,69E+01	Tr
CG15896	CG15896	A	-2,85	1,85E-07	1,52E+01	CG
CG16884	BG:DS00180.3	O/A*	-2,64	1,64E-02	1,24E+02	CG
CG16885	CG16885	I/A*	-7,40	4,34E-03	2,54E+01	CG
CG16947	CG16947	I/A*	-2,50	4,47E-03	5,05E+01	CGh
CG17104	CG17104	A*	-1,77	3,12E-02	7,00E+03	CG
CG1718	CG1718	A*	-1,02	3,21E-03	5,06E+03	Tr
CG17211	CG17211	A/I	-1,42	1,03E-08	1,01E+03	CGh
CG17278	CG17278	A*	-1,16	8,87E-03	1,24E+01	Sig
CG17374	CG17374	A*	-2,36	1,10E-05	5,12E+03	M
CG17684	CG17684	A*	-1,27	1,11E-04	5,37E+03	P
CG17698	CG17698	O/I	-1,53	1,69E-02	3,74E+02	P
CG18213	CG18213	A/A*	-3,72	4,05E-08	2,37E+02	CGh
CG18343	CG18343	A/I/O	-2,00	4,94E-08	1,48E+03	CG
CG18522	CG18522	A*	-2,60	1,39E-02	6,49E+03	RedOx
CG18547	CG18547	A*	-1,04	5,15E-04	9,44E+03	RedOx
CG18563	CG18563	O	-2,05	1,83E-02	4,55E+01	P
CG18600	CG18600	A/I	-1,51	5,58E-06	1,35E+03	ADN
CG2064	CG2064	A*	-1,63	1,10E-04	7,94E+03	RedOx
CG2145	CG2145	A/I/O	-2,64	8,26E-10	5,48E+02	P
CG3008	CG3008	A*	-1,33	1,02E-02	1,04E+01	P
CG30196	CG30196	A*	-1,24	4,41E-04	6,38E+03	Sig
CG30217	CG13514	A*	-1,68	2,45E-03	7,51E+03	Sig
CG3036	CG3036	O/I/A*	-1,64	1,52E-02	1,77E+02	Tr
CG31098	CG31098	I/A*	-2,09	3,90E-03	1,38E+01	P
CG31547	CG31547	A*	-1,14	4,27E-03	5,51E+03	Tr
CG31607	CG31607	A	-2,0	1,04E-04	4,51E+02	CG
CG31961	CG31961	I	-29,8	1,86E-05	7,19E+00	CGh
CG31997	CG31997	O/I/A*	-1,68	6,70E-04	1,38E+03	CG



TABLA 1 UAS- (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
CR43361	CG32021	A*	-2,66	1,85E-02	6,73E+03	CG
CG32055	CG32055	I/A*	-2,81	3,45E-03	3,46E+01	Sig
CG32066	CG6487	I	-2,12	9,24E-04	5,87E+01	CG
CG32107	CG32107	I	-4,39	4,51E-03	2,87E+01	CG
CG32278	CG12032	I/O	-1,63	2,16E-04	2,77E+02	CG
CG32364	CG32364	I/O/A*	-2,38	2,24E-03	4,97E+01	ADN
CG32368	CG32368	O/A*	-2,02	1,89E-02	2,47E+01	CG
CG32372	CG32372	A/I	-1,93	1,31E-06	7,59E+02	CGh
CG32373	CG32373	A/I/O/A*	-7,08	5,51E-10	9,12E+01	Sig
CG32495	CG32495	A/I/O	-1,66	2,87E-11	8,52E+02	RedOx
CG32625	CG32625	A*	-1,27	3,41E-04	5,60E+00	CGh
CG3339	CG3339	A*	-2,26	8,76E-02	5,98E+03	Cy
CG33960	CG33960	A*	-1,12	1,01E-03	9,08E+03	Sig
CG33970	CG31085/CG6162	A/I/A*	-2,08	1,55E-07	4,21E+02	Tr
CG34002	CG34002	A*	-2,85	1,46E-04	5,21E+03	CG
CG34406	CG3485	A*	-1,40	1,01E-04	6,47E+03	ADN
CG3568	CG3568	A/A*	-3,19	4,61E-08	1,97E+02	CG
CG3625	CG3625	A/I/A*	-2,13	6,17E-09	1,78E+03	CGh
CG3649	CG3649	A	-3,2	8,36E-05	1,54E+02	Tr
CG3726	CG3726	A*	-1,03	1,82E-04	6,12E+03	ADN
CG3857	CG3857	I/A/A*	-2,64	3,81E-04	5,67E+01	CG
CG3902	CG3902	I/A	-1,84	7,09E-04	3,53E+03	RedOx
CG40006	CG40006	A/O/A*	-2,30	7,36E-06	1,86E+02	CA
CG41284	CG41284	A*	-1,25	2,29E-04	6,15E+03	CG
CG4210	CG4210	A*	-1,24	1,52E-02	9,37E+03	M
CG4398	CG4398	A/O	-3,44	5,24E-06	5,32E+01	Sig
CG4409	CG4409	A*	-4,94	9,75E-06	7,95E+03	CG
CG5335	CG5335	A*	-1,12	2,81E-03	5,93E+03	M
CG5431	CG5431	I	-2,16	3,04E-03	2,77E+01	M
CG5535	CG5535	A/I/A*	-2,14	7,32E-06	2,46E+02	Tr
CG6272	CG6272	A*	-1,18	7.17e-06	9,91E+03	ADN

TABLA 1 UAS- (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>CG6470</i>	<i>CG6470</i>	A	-5,75	1,92E-09	1,60E+01	CGh
<i>CG6983</i>	<i>CG6983</i>	O	-3,80	1,37E-02	4,92E+01	CG
<i>CG7080</i>	<i>CG7080</i>	A*	-1,15	2,29E-04	6,73E+03	CG
<i>CG7201</i>	<i>CG7201</i>	I/O/A*	-3,10	1,40E-05	8,31E+01	CG
<i>CG7224</i>	<i>CG7224</i>	O	-1,94	1,52E-02	1,51E+02	CG
<i>CG7787</i>	<i>CG7787</i>	A	-1,92	7,53E-08	6,84E+02	Sig
<i>CG7997</i>	<i>CG7997</i>	A*	-1,42	1,90E-03	6,66E+03	M
<i>CG8317</i>	<i>CG8317</i>	I/O	-2,65	9,13E-04	9,10E+01	CG
<i>CG8441</i>	<i>CG8441</i>	I	-2,03	7,43E-04	1,40E+02	CG
<i>CG8654</i>	<i>CG8654</i>	A/O	-1,70	5,92E-08	9,35E+01	Tr
<i>CG8768</i>	<i>CG8768</i>	O/A	-2,04	6,39E-03	1,38E+02	M
<i>CG8939</i>	<i>CG8939</i>	A/I	-1,77	4,94E-06	5,70E+02	R
<i>CG9008</i>	<i>CG9008</i>	A/I	-1,74	7,35E-06	1,34E+03	M
<i>CG9027</i>	<i>CG13200</i>	A/I	-1,68	7,60E-06	5,69E+03	RedOx
<i>CG9312</i>	<i>CG9312</i>	I	-2,06	4,45E-03	3,45E+01	CG
<i>CG9662</i>	<i>CG9662</i>	A	-2,74	5,13E-10	1,23E+03	M
<i>CG9836</i>	<i>CG9836</i>	A*	-1,03	7,10E-02	1,04E+01	M
<i>CG9850</i>	<i>CG11169</i>	A/A*	-4,65	7,46E-06	2,23E+01	P
<i>Clect27</i>	<i>CG3244</i>	A*	-1,23	1,75E-03	8,70E+03	CGh
<i>Cpr64Aa</i>	<i>CG15006</i>	A*	-1,31	3,94E-03	1,04E+01	Cut
<i>CR30055</i>	<i>CG30055</i>	A	-2,24	1,34E-07	3,79E+01	CG
<i>cul-2</i>	<i>CG1512</i>	A*	-1,40	1,13E-02	1,06E+01	P
<i>Cyp4e2</i>	<i>CG2060</i>	A/I/O/A*	-3,45	1,08E-10	5,65E+02	RedOx
<i>Cyp6a17</i>	<i>CG10241</i>	A/O/A*	-23,94	3,37E-06	3,22E+01	RedOx
<i>Cyp6d2</i>	<i>CG4373</i>	I/A*	-2,12	1,86E-03	5,50E+00	RedOx
<i>Cyp9f3ψ</i>	<i>CR17875</i>	A*	-1,11	5,59E-04	5,80E+03	M
<i>Dip2</i>	<i>CG9771</i>	A/O/I	-1,56	8,08E-06	1,10E+03	ADN
<i>DI</i>	<i>CG3619</i>	I	-2,42	2,40E-06	2,01E+02	Sig
<i>Doc1</i>	<i>CG5133</i>	A/I/O/A*	-2,65	4,72E-07	6,34E+02	ADN
<i>Doc2</i>	<i>CG5187</i>	A/I/O/A*	-3,15	1,02E-07	2,37E+02	ADN
<i>Dscam4</i>	<i>CG42330</i>	A*	-1,50	1,40E-03	5,66E+03	CGh

TABLA 1 UAS- (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>dve</i>	CG5799	I/O/A*	-2,25	3,84E-05	4,20E+02	ADN
<i>Ect3</i>	CG3132	A/I/O/A*	-23,61	9,09E-10	7,50E+01	M
<i>Ect4</i>	CG34373/CG13680	I/O	-2,25	2,34E-03	5,09E+00	Sig
<i>Eip55E</i>	CG5345	O/I/A	-1,44	2,55E-03	9,77E+02	M
<i>escl</i>	CG5202	A*	-1,15	1,64E-04	1,00E+01	ADN
<i>fbp</i>	CG31692	O/I	-1,61	9,61E-03	1,57E+03	M
<i>fru</i>	CG14307	A*	-2,70	1,84E-04	6,18E+03	ADN
<i>fs(1)Yb</i>	CG2706	A*	-4,21	1,69E-03	6,45E+03	ADN
<i>gkt</i>	CG8825	A*	-1,18	1,60E-02	6,58E+03	CGh
<i>Gr61a</i>	CG13888	O/A*	-1,93	1,31E-02	2,66E+01	Sig
<i>Gr64a</i>	CG32261	A*	-1,48	2,14E-02	4,83E+03	Sig
<i>GS</i>	CG6835	I	-1,9	1,64E-04	7,90E+01	M
<i>Gs1l</i>	CG15441	A*	-1,30	1,02E-02	7,31E+00	M
<i>GstE1</i>	CG5164	I/A*	-1,96	3,60E-03	1,58E+02	RedOx
<i>GstE5</i>	CG17527	A*	-1,84	1,54E-03	7,20E+03	RedOx
<i>GstE6</i>	CG17530	A*	-4,28	2,09E-02	7,93E+03	RedOx
<i>H2.0</i>	CG11607	I	-3,62	5,67E-05	4,48E+01	ADN
<i>His2A</i>	CG31618	A*	-1,03	6,58E-03	7,89E+00	ADN
<i>His4:CG31611</i>	CG31611	A/I/A*	-7,35	1,05E-05	1,98E+02	ADN
<i>ImpE1</i>	CG32356	I	-2,14	2,20E-03	1,22E+02	CGh
<i>Indy</i>	CG3979	A	-2,00	8,30E-08	2,73E+03	Tr
<i>Irbp</i>	CG5247	A*	-1,16	2,68E-02	8,33E+03	ADN
<i>l(2)03659</i>	CG8799	A*	-2,99	2,74E-03	6,20E+03	Tr
<i>l(2)06496</i>	CG9893	A/I	-5,25	1,45E-09	5,92E+02	Cy
<i>l(2)34Fc</i>	CG7532	A*	-1,07	9,84E-04	8,72E+03	P
<i>l(2)41Ab</i>	CG41265	A*	-1,03	5,33E-03	5,61E+03	CG
<i>l(2)dtl</i>	CG11295	I	-4,29	5,09E-03	4,32E+01	CGh
<i>l(3)mbn</i>	CG12755	A	-5,38	6,41E-08	2,14E+01	Cut
<i>l(3)S147910/ver</i>	CG14121	A*	-1,94	1,39E-02	7,64E+03	ADN
<i>m4</i>	CG6099	A/I/O/A*	-2,41	5,36E-07	7,31E+02	Sig
<i>mbi</i>	CG33197	A*	-1,08	4,33E-04	7,14E+03	ADN

TABLA 1 UAS- (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>Men</i>	CG10120	A	-2,8	3,70E-04	4,33E+02	RedOx
<i>Mhc</i>	CG17927	I	-2,07	4,84E-03	2,45E+01	Cy
<i>miple</i>	CG1221	I/O	-1,48	2,19E-03	4,37E+02	Sig
<i>mre11</i>	CG16928	A*	-0,72	5,06E-04	9,68E+03	ADN
<i>Msh6</i>	CG7003	A	-2,36	8,43E-09	9,10E+02	ADN
<i>Mst57Db</i>	CG5016	A	-5,01	1,53E-06	1,73E+01	CGh
<i>nab</i>	CG15000	I/O/A*	-3,53	1,31E-04	1,83E+02	ADN
<i>nemy</i>	CG8776	A/A*	-2,37	3,79E-08	6,37E+01	RedOx
<i>Nep1</i>	CG5905	I/O/A*	-2,84	6,38E-04	1,94E+01	P
<i>net</i>	CG11450	O	-1,91	1,44E-02	9,40E+01	ADN
<i>nub</i>	CG34395	I/A/O/A*	-2,06	2,65E-05	2,67E+02	ADN
<i>Obp56a</i>	CG11797	I/A/O	-2,91	6,41E-03	1,03E+02	Sig
<i>opa</i>	CG1133	A/O/I/A*	-2,07	7,13E-09	5,41E+02	ADN
<i>Optix</i>	CG18455	A/I/O/A*	-29,15	2,88E-06	6,69E+01	ADN
<i>Osi14</i>	CG1155/Sp558	A*	-1,45	2,75E-04	7,04E+03	CG
<i>ox</i>	CG8764	I	-2,04	8,88E-04	1,87E+02	M
<i>path</i>	CG3424	A*	-2,01	7,40E-02	9,68E+03	Tr
<i>pdm2</i>	CG12287	I/A/O/A*	-2,32	8,70E-03	1,06E+01	ADN
<i>PebIII</i>	CG11390	A	-2,67	1,72E-06	2,99E+01	CGh
<i>PFE</i>	CG15151/rdo	A/I/O	-1,92	2,04E-07	1,52E+03	CGh
<i>pgant2</i>	CG3254	A	-2,75	1,44E-06	2,00E+01	Go
<i>Poxn</i>	CG8246	O/I	-1,53	2,29E-02	1,74E+02	ADN
<i>ppk20</i>	CG7577	A/I	-1,57	2,21E-07	1,44E+03	Tr
<i>Prx2540-2</i>	CG11765	A*	-2,10	3,32E-04	6,94E+03	RedOx
<i>Rala</i>	CG2849	A/I	-2,05	9,10E-09	1,71E+03	Sig
<i>rev7</i>	CG2948	A	-2,46	2,95E-06	2,93E+01	ADN
<i>robo</i>	CG13521	I/A	-1,81	1,91E-04	3,34E+01	CA
<i>rpk</i>	CG1058	O/I/A*	-1,63	1,29E-02	1,09E+02	Tr
<i>RpL28</i>	CG12740	I/A*	-1,97	2,31E-03	1,18E+02	R
<i>RpS21/oho23B</i>	CG2986	O	-7,33	5,17E-04	9,69E+03	R
<i>ry</i>	CG7642	A*	-2,82	1,57E-03	5,99E+00	RedOx

TABLA 1 UAS- (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>salm</i>	CG6464	A/I/A*	-3,78	2,56E-07	1,94E+03	ADN
<i>salr</i>	CG4881	A/I/O/A*	-4,39	7,40E-08	3,26E+02	ADN
<i>sda</i>	CG5518	I/A/O	-1,60	5,21E-04	5,32E+02	P
<i>sens</i>	CG32120	A*	-1,00	1,93E-04	6,33E+00	ADN
<i>Snap25</i>	CG40452	A*	-4,23	5,69E-05	7,86E+03	CGh
<i>Spn47C</i>	CG7722	A*	-1,39	2,16E-04	7,08E+03	P
<i>Spt-I</i>	CG4016	A/I	-1,67	1,89E-07	8,21E+02	P
<i>TepIV</i>	CG10363	I/A/O	-2,31	8,92E-05	5,70E+01	P
<i>tey</i>	CG8780	A/O/A*	-3,33	5,49E-09	1,86E+02	ADN
<i>Tie</i>	CG7525	A	-3,0	8,24E-04	1,89E+02	P
<i>Trim9</i>	CG31721/CG6256	I/A*	-2,06	8,93E-03	4,19E+01	CGh
<i>Trx-2</i>	CG31884	I/O	-11,06	4,26E-03	2,05E+01	ADN
<i>Ubp64E</i>	CG5486	A*	-1,19	2,31E-04	1,03E+01	P
<i>Ubqn</i>	CG14224	I/O	-1,80	5,23E-03	2,54E+02	P
<i>UGP</i>	CG4347	A*	-1,34	1,96E-04	5,45E+03	M
<i>Ugt86Da</i>	CG18578	A	-1,5	1,63E-07	8,84E+02	M
<i>Ugt86Di</i>	CG6658	A*	-2,85	1,36E-03	9,42E+03	M
<i>unc-13</i>	CG2999	A*	-1,65	4,61E-02	1,01E+01	Sig
<i>vvl</i>	CG10037	A/I	-2,06	1,00E-07	1,95E+02	ADN

TABLA 1 UAS+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>Aldh</i>	CG3752	I/O	2,12	2,85E-04	1,13E+02	M
<i>Ank2</i>	CG42734	A	3,09	1,72E-08	6,12E+02	Cy
<i>AnnIX</i>	CG5730	I/O/A	1,92	7,86E-04	1,08E+02	Cy
<i>b6</i>	CG3100	A*	1,53	7,52E-04	5,24E+03	Sig
<i>Blimp-1</i>	CG5249	A*	1,08	2,92E-03	8,16E+03	ADN
<i>Cad86C</i>	CG42601/CG4655	I/O/A*	1,88	4,06E-05	8,10E+01	CA
<i>CG10041</i>	CG10041	I	3,57	9,76E-03	2,33E+01	P
<i>CG10176</i>	CG10176	A	2,55	9,62E-08	1,67E+03	CG

TABLA 1 UAS+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
CG10681	CG10681	I/O/A	2,30	6,81E-04	2,59E+01	CGh
CG11380	EG:BACR42I17.7	A/I/A*	6,67	7,19E-07	2,95E+02	CG
CG11550	CG11550	I/O/A/A*	2,60	3,56E-04	3,37E+02	CGh
CG11652	CG11652	O/I	1,66	8,97E-02	2,03E+02	CGh
CG11779	CG11779	A	1,95	4,04E-06	3,39E+02	Tr
CG11905	CG11905	A*	1,32	4,10E-04	7,63E+03	Cy
CG12256	CG12256	A*	1,32	4,54E-04	6,19E+03	P
CG1273	CG1273	I/O/A*	1,73	7,32E-04	8,89E+01	CG
CG13045	CG13045	A*	1,22	9,66E-04	5,80E+03	CG
CG13053	CG13053	A/I/O/A*	10,24	4,27E-07	1,82E+03	CG
CG13062	CG13062	A/I/O/A*	9,93	2,74E-06	8,53E+01	CG
CG13063	CG13063	I	16,87	6,69E-03	3,68E+02	CG
CG13064	CG13064	A*	1,03	1,80E-03	8,52E+03	CG
CG13067	CG13067	I	1,95	5,73E-03	5,19E+01	CG
CG13258	CG13258	A/I/O/A*	3,75	1,44E-07	1,50E+02	CG
CG13618	CG13618	A*	1,18	1,61E-03	4,17E+03	CGh
CG13631	CG13631	I	2,47	1,12E-03	3,77E+01	CG
CG13699	CG13699	A/A*	7,16	8,03E-06	4,91E+01	CG
CG13737	CG13737	A/I	1,85	3,87E-07	2,48E+02	CG
CG13850	CG13850	A	3,44	2,70E-06	2,89E+01	P
CG13965	CG13965	A	2,14	9,64E-07	1,66E+01	CG
CG14082	CG14082	A	28,09	1,89E-06	4,70E+01	CG
CG14326	CG14326	O	7,38	3,67E-02	7,61E+01	CG
CG14470	CG14470	A/I/A*	2,75	3,91E-06	1,01E+03	P
CG14567	CG14567	A/I/O	3,50	1,55E-06	2,16E+02	CG
CG14590	CG14590	A	2,02	1,49E-06	6,27E+01	ADN
CG14598	CG14598	A*	1,14	1,69E-03	8,46E+03	CG
CG15023	CG15023	O	1,91	2,41E-02	2,90E+01	CG
CG15046	CG15046	I/O	1,81	1,24E-03	3,41E+01	P
CG15251	CG15251	A	2,08	3,69E-07	8,79E+01	CG
CG15279	CG15279	A*	1,09	3,74E-03	5,41E+03	Tr

TABLA 1 UAS+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
CG15345	CG15345	I	6,91	3,81E-04	2,76E+01	CG
CG15544	CG15544	A*	1,41	3,75E-04	8,19E+03	CG
CG15628	CG15628	A*	2,19	9,05E-02	6,58E+03	M
CG1572	CG1572	A/O/I	1,88	1,70E-07	1,18E+03	CGh
CG15745	CG15745	A*	1,34	4,57E-04	6,15E+03	CG
CG1600	CG1600	I/A/O	1,74	4,45E-05	2,33E+03	RedOx
CG16700	CG16700	A*	2,08	2,22E-04	6,49E+03	Tr
CG16733	CG16733	I/O/A*	1,54	6,80E-03	6,33E+02	M
CG16786	CG16786	I/O	1,63	2,15E-05	1,52E+02	CGh
CG17018	CG17018	A*	1,03	6,33E-04	6,06E+03	ARN
CG17085	CG43129	A	2,49	3,96E-06	4,29E+01	CGh
CG17726	CG17726	A	2,09	3,13E-06	1,57E+02	CG
CG17843	CG17843	I/O	1,84	2,20E-04	9,37E+01	RedOx
CG18110	CG18110	A*	3,23	5,92E-03	5,41E+03	Tr
CG1835	CG1835	I/O	2,48	7,56E-03	7,42E+00	CG
CG18358	CG18358	A/I/O	2,09	4,13E-09	2,16E+02	CGh
CG18490	CG42671	O/A	1,42	6,48E-02	6,85E+01	CG
CG18853	CG18853	I/O	2,85	7,27E-07	5,37E+02	ADN
CG2150	CG2150	I/O/A*	2,14	9,87E-04	1,64E+01	CGh
CG2177	CG2177	I/A*	2,45	6,68E-04	7,01E+02	Tr
CG2617	CG2617	O	4,31	8,75E-02	5,47E+02	CGh
CG2975	CG2975	O/I	1,44	3,98E-02	3,51E+01	M
CG30015	CG30015	I/A	2,13	7,09E-04	3,17E+02	CG
CG30089	CG30089	A	3,37	8,63E-07	2,42E+01	CGh
CG30101	CG30101	A*	1,27	5,34E-03	4,38E+03	CG
CG30152	CG30152	I	1,90	1,10E-03	2,21E+01	CG
CG30428	CG30428	A*	1,46	3,21E-04	7,60E+00	CG
CG3097	CG3097	I/O/A*	4,06	5,82E-04	1,24E+01	P
CG31176	CG6328	A/A*	2,93	7,80E-07	2,47E+02	CG
CG31559	CG31559	A*	1,31	1,08E-03	6,99E+03	RedOx
CG31705	CG31705	A*	1,31	3,09E-02	9,30E+03	CG



TABLA 1 UAS+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
CG32027	CG32027	A*	2,99	5,96E-03	6,36E+03	CG
CG32111	CG32111	A	2,22	1,81E-07	1,76E+01	CG
CG32137	CG32137	A/I/A*	1,81	1,14E-06	1,13E+03	CGh
CG32412	CG32412	I	1,51	5,66E-03	2,29E+02	P
CG32452	CG32452	A	2,58	1,07E-07	3,90E+02	CG
CG32479	CG32479	I	2,79	1,25E-04	1,89E+03	M
CG32809	EG:171E4.3	A	1,97	2,56E-09	2,73E+03	Cy
CG32850	CG32850	A*	4,63	1,24E-02	9,02E+03	CGh
CG33257	CG33257	A	1,99	6,75E-08	2,32E+01	CG
CG34205	CG34205	A/I/O/A*	1,61	5,89E-03	1,70E+02	CG
CG34247	CG34247	A*	7,03	2,44E-04	9,28E+03	CG
CG34288	CG34288	I/O	1,45	2,99E-02	1,19E+02	CG
CG3436	CG3436	O	1,90	1,74E-03	1,65E+02	ARN
CG3837	CG3837	A/O/I/A*	1,97	9,01E-06	6,55E+02	Sig
CG4098	CG4098	I/O	1,46	2,51E-03	8,97E+01	M
CG42613	CG5449/CG31149	I	46,70	5,00E-03	2,59E+01	CGh
CG4267	CG4267	A*	1,01	3,19E-02	4,46E+03	M
CG4382	CG4382	A*	1,14	3,50E-02	9,93E+03	M
CG4511	CG4511	I/O	3,74	2,64E-05	2,06E+02	M
CG4565	CG4565	A*	1,05	6,25E+03	6,09E+00	ADN
CG4586	CG4586	A*	1,22	4,85E-03	8,35E+03	M
CG4998	CG4998	I/A*	2,76	1,93E-03	3,44E+01	P
CG5022	CG5022	I	1,95	2,25E-03	1,70E+01	Cy
CG5065	CG5065	A*	1,19	1,26E-03	5,46E+03	M
CG5217	CG5217	A	2,17	8,49E-07	7,76E+01	CG
CG5428	CG5428	O	1,94	2,44E-02	5,65E+01	M
CG5835	CG5835	I/O	1,86	4,05E-03	3,18E+02	CG
CG6023	CG6023	I	1,80	5,87E-03	9,37E+01	CG
CG6043	CG6043	A*	1,60	3,42E-03	5,85E+03	CGh
CG6206	CG6206	A*	1,68	6,54E-04	8,22E+03	M
CG6357	CG6357	I/O/A*	2,12	1,37E-03	7,88E+01	P

TABLA 1 UAS+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>CG6654</i>	<i>CG6654</i>	I/A/O	2,16	1,27E-03	2,46E+01	ADN
<i>CG6701</i>	<i>CG6701</i>	I/A/A*	1,77	3,55E-04	8,96E+01	ADN
<i>CG7173</i>	<i>CG7173</i>	A*	1,23	6,07E-04	7,71E+03	P
<i>CG7367</i>	<i>CG7367</i>	I/A/O/A*	3,22	5,18E-06	7,38E+01	M
<i>CG7565</i>	<i>CG7565</i>	A/O/A*	2,06	2,24E-06	1,56E+02	Cut
<i>CG7900</i>	<i>CG7900</i>	A/O/I/A*	2,90	3,19E-07	6,50E+02	M
<i>CG8172</i>	<i>CG8172</i>	A*	1,01	5,91E-06	4,62E+03	P
<i>CG8360</i>	<i>CG8360</i>	A/I	1,87	2,94E-08	2,71E+02	M
<i>CG8451</i>	<i>CG8451</i>	I/A/O/A*	26,24	5,87E-03	2,74E+01	Tr
<i>CG8773</i>	<i>CG8773</i>	A	2,55	9,59E-06	1,54E+01	P
<i>CG9238</i>	<i>CG9238</i>	A/A*	2,07	6,38E-10	5,03E+02	P
<i>CG9689</i>	<i>CG9689</i>	I/O	2,06	1,14E-04	1,80E+02	CG
<i>CG9691</i>	<i>CG9691</i>	I/A/O	1,80	5,16E-04	2,09E+03	CG
<i>CG9747</i>	<i>CG9747</i>	I/O/A*	2,85	7,50E-04	2,13E+02	RedOx
<i>CG9812</i>	<i>CG9812</i>	A/I/O/A*	2,41	3,25E-09	7,34E+02	CG
<i>Cirl</i>	<i>CG8639</i>	A*	1,41	2,06E-03	6,98E+03	Sig
<i>Ckl1alpha-i3</i>	<i>CG3217</i>	I/O	1,49	9,29E-04	8,14E+01	CG
<i>Clic</i>	<i>CG10997</i>	I/A	1,74	4,70E-04	1,82E+02	M
<i>Cpr100A</i>	<i>CG12045</i>	A/A*	7,36	4,84E-06	1,13E+02	Cut
<i>Cpr31A</i>	<i>CG33302</i>	A/A*	3,49	2,77E-08	2,44E+02	Cut
<i>Cpr49Ah</i>	<i>CG8515</i>	A/I/O	2,07	6,36E-06	3,78E+02	Cut
<i>Cpr62Bb</i>	<i>CG13935</i>	I	1,90	2,01E-03	3,67E+01	Cut
<i>Cpr66D</i>	<i>CG32029</i>	A/I/O	2,64	1,23E-07	9,73E+02	Cut
<i>Cpr72Ea</i>	<i>CG4818</i>	A/I/O/A*	268,86	3,00E-13	8,28E+02	Cut
<i>Cpr97Ea</i>	<i>CG6131</i>	I/O/A*	4,70	1,40E-03	1,57E+01	Cut
<i>Cpr97Eb</i>	<i>CG15884</i>	O/A*	2,07	2,04E-02	3,38E+01	Cut
<i>CRMP</i>	<i>CG1411</i>	I/A*	2,14	2,02E-03	5,75E+01	M
<i>cv-2</i>	<i>CG15671</i>	A/I/O/A*	5,49	2,65E-06	1,25E+02	CG
<i>Cyp18a1</i>	<i>CG6816</i>	I/A/O/A*	35,15	9,87E-05	5,41E+01	RedOx
<i>Cyp303a1</i>	<i>CG4163</i>	O	7,61	4,84E-02	1,19E+02	RedOx
<i>Cyp4p1</i>	<i>CG10842</i>	A*	1,56	2,53E-02	5,27E+03	RedOx

TABLA 1 UAS+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>Cyp4p2</i>	CG1944	A*	3,41	8,49E-03	6,29E+03	RedOx
<i>dap</i>	CG1772	I/O	1,83	2,33E-05	1,45E+03	M
<i>daw</i>	Alp23B/CG16987	I/A/O/A*	2,37	6,32E-04	1,18E+02	Sig
<i>Ddc</i>	CG10697	A*	1,34	8,71E-04	6,20E+00	M
<i>Dg</i>	CG18250	I/A/A*	2,06	2,28E-03	2,29E+02	Cy
<i>DI</i>	CG3619	A/I	1,75	7,07E-06	2,72E+03	Sig
<i>Dlic</i>	CG1938	I/O	1,45	1,70E-03	9,25E+02	Cy
<i>ADNJ-1</i>	CG10578	I	2,13	2,16E-04	9,05E+02	Cy
<i>drm</i>	CG10016	I/O/A	1,67	4,40E-04	2,79E+02	CGh
<i>Dsno</i>	CG34421/SD06617	A*	2,56	1,46E-04	5,12E+03	Sig
<i>dy</i>	CG9355	A/I/A*	3,14	1,01E-06	2,74E+02	Cut
<i>e</i>	CG3331	O/A*	2,90	2,66E-02	3,88E+01	M
<i>E23</i>	CG3327	A*	1,28	1,54E-04	6,45E+03	Tr
<i>Edg91</i>	CG7539	O	2,30	1,02E-02	4,25E+01	Cut
<i>Ef1alpha100E</i>	CG1873	A*	2,57	7,31E-02	9,62E+03	ARN
<i>emc</i>	CG1007	O/I	1,69	4,02E-02	7,57E+03	ADN
<i>Epac</i>	CG34392	A/A*	5,24	1,32E-06	1,23E+02	M
<i>esn</i>	CG12833	O/A	1,61	4,42E-02	9,11E+02	CGh
<i>Ets21C</i>	CG2914	A*	1,48	1,56E-03	5,23E+03	ADN
<i>Fmo-2</i>	CG3174	O	1,92	2,85E-03	4,74E+01	RedOx
<i>Gld</i>	CG1152	A/I/O/A*	2,95	4,26E-10	9,99E+02	RedOx
<i>gprs</i>	CG18471	A	3,09	7,07E-07	2,06E+01	CGh
<i>His-Ψ:CR31614</i>	CR31614	I	2,26	2,31E-03	4,78E+01	CR
<i>His1:CG31617</i>	CG31617	I/O	2,74	4,75E-03	4,98E+01	ADN
<i>Hsp67Bb/HsP22</i>	CG32041	I	2,35	7,50E-03	1,14E+03	P
<i>Hsp67Bc</i>	CG4190	I	2,09	2,07E-03	1,64E+02	P
<i>Idgf4</i>	CG1780	I/A/O	1,97	1,10E-04	1,79E+03	Sig
<i>ImpL2</i>	CG15009	I/A/O/A*	3,53	1,71E-05	9,42E+02	CA
<i>ImpL3</i>	CG10160	A*	1,93	7,76E-04	8,25E+03	M
<i>insc</i>	CG11312	I	1,99	5,43E-05	1,33E+02	ARN
<i>IP3K1</i>	CG4026	I/A	2,24	9,77E-03	1,54E+02	M

TABLA 1 UAS+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>IP3K2</i>	CG34359	A*	1,15	8,83E-02	9,59E+03	M
<i>jbug</i>	CG30092/CG11605	I	1,91	6,07E-05	5,30E+02	Cy
<i>kay</i>	CG33956	I/O	1,77	1,41E-04	1,58E+03	ADN
<i>krimp</i>	CG15707	A*	1,37	1,36E-03	5,95E+03	ARN
<i>lama</i>	CG10645	A/O/A*	2,37	3,37E-07	9,43E+02	CG
<i>LBR</i>	CG17952	O/I	1,61	5,95E-03	6,65E+02	CGh
<i>Lcp65Ad</i>	CG6955	I/O/A*	9,61	1,48E-04	2,35E+01	Cut
<i>lola</i>	CG12052	I	2,35	4,89E-06	2,14E+02	ADN
<i>m</i>	CG9369	I/O/A*	2,94	3,93E-03	1,57E+02	Cut
<i>mirr</i>	CG10601	I/A/O	3,25	2,16E-03	1,07E+02	ADN
<i>moody</i>	CG4322	A/A*	2,65	3,62E-06	3,48E+02	Sig
<i>NC2</i>	CG10318	A	141,27	7,82E-11	1,28E+03	ADN
<i>nemy</i>	CG8776	A*	1,46	1,58E-03	7,71E+03	RedOx
<i>NetA</i>	CG18657	A*	1,02	3,04E-03	7,47E+00	CGh
<i>nod</i>	CG1763	A*	1,34	3,39E-02	7,67E+03	ADN
<i>Nox</i>	CG34399/CG3896	I/O	1,76	1,10E-03	5,77E+01	RedOx
<i>Npc2b</i>	CG3153	A/I/O/A*	4,21	7,09E-07	1,17E+02	CA
<i>NT1</i>	CG42576/CG32242	A/A*	2,11	3,49E-06	9,30E+01	CD
<i>nuf</i>	CG33991	O/I	1,53	2,03E-02	1,24E+03	Cy
<i>Obp83g</i>	CG31558	I/A/O/A*	2,06	3,00E-03	1,80E+02	Tr
<i>odd</i>	CG3851	I/O	1,92	9,83E-03	7,51E+01	ADN
<i>os</i>	CG5993	A/O	1,82	2,33E-07	3,18E+02	Cy
<i>pgant8</i>	CG7297	A*	1,02	3,30E-04	5,68E+03	M
<i>PGRP-SA</i>	CG11709	O	1,97	8,01E-03	7,67E+01	CGh
<i>Phk-3</i>	CG9358	I/A	1,66	1,59E-03	7,59E+02	Sig
<i>phr</i>	CG11205	A*	1,66	3,66E-02	9,85E+03	ADN
<i>pinta</i>	CG13848	A/I/A*	2,14	5,39E-06	1,93E+02	M
<i>Pka-C1</i>	CG4379	A*	1,14	8,02E-04	8,06E+00	Sig
<i>pncr002:3R</i>	CR33938/LP03188	A*	1,68	2,53E-04	1,18E+01	ARN
<i>pnt</i>	CG17077	A*	1,16	2,11E-02	6,56E+00	ADN
<i>ppk20</i>	CG7577	A*	5,55	1,08E-04	6,19E+03	Tr

TABLA 1 UAS+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>pst</i>	CG8588	A/I/O/A*	5,35	9,05E-07	7,01E+02	M
<i>Ptr</i>	CG11212	A*	1,53	6,79E-04	6,97E+03	Sig
<i>Pu</i>	CG9441	A*	1,27	1,34E-03	6,64E+03	Cut
<i>qua</i>	CG6433	A*	1,18	4,42E-04	4,52E+00	Cy
<i>rap</i>	CG3000	I	2,02	3,84E-03	2,19E+01	Cy
<i>Rcd6</i>	CG11175	A/I/A*	2,24	6,32E-07	2,58E+02	CG
<i>rols</i>	CG32096	A/I	1,54	5,10E-11	1,50E+03	CA
<i>RpL27</i>	CG4759	I/O	1,57	6,22E-05	1,23E+03	R
<i>rpr</i>	CG4319	I/O/A*	2,46	9,63E-07	1,19E+02	M
<i>salm</i>	CG6464	O	2,03	1,89E-03	2,44E+02	ADN
<i>scaf</i>	CG11066	I/O/A*	2,62	2,99E-04	3,28E+01	P
<i>scb</i>	CG8095	A/I/A*	2,17	3,45E-08	9,35E+02	CA
<i>scrib</i>	CG42614	O	2,35	1,81E-02	3,14E+01	CA
<i>Sema-1a</i>	CG18405	A/A*	2,35	9,94E-09	1,78E+02	CGh
<i>shn</i>	CG7734	A*	1,40	7,40E-04	8,14E+03	ADN
<i>slow</i>	CG7447	I/O/A*	1,82	3,06E-03	4,84E+02	CA
<i>sm</i>	CG9218	A*	1,29	1,02E-03	7,29E+03	ARN
<i>sob</i>	CG3242	A/O/A*	1,84	2,55E-06	9,28E+02	ADN
<i>Spn100A</i>	CG1342	A*	2,00	2,88E-04	8,69E+00	P
<i>Spn43Aa</i>	CG12172	A/O/I/A*	2,28	1,09E-06	9,61E+03	P
<i>Spz3</i>	CG7104	O/I	1,59	7,70E-02	1,54E+02	CG
<i>stv</i>	CG32130/CG10745	A	1,92	1,69E-03	3,12E+03	P
<i>swi2</i>	CG14485	A*	1,40	1,96E-02	5,11E+03	Sig
<i>SytIV</i>	CG10047	A*	4,15	3,68E-02	5,70E+03	Tr
<i>tal-2A</i>	CG42385/LD11162	A*	1,56	5,95E-03	8,34E+03	CG
<i>Teh3</i>	CG18676	A	2,30	4,14E-06	4,92E+01	R
<i>tej</i>	CG8589	A	4,65	5,21E-06	1,77E+01	ADN
<i>Timp</i>	CG6281	A/I/O/A*	4,56	1,62E-08	5,86E+02	CA
<i>tnc</i>	CG13648	A*	1,48	2,60E-04	7,83E+03	CGh
<i>trio</i>	CG18214	A/I	1,72	1,30E-06	1,48E+02	Sig
<i>Tsp42Ea</i>	CG18817/CG3364	O/I/A*	1,62	1,76E-02	2,27E+03	CGh

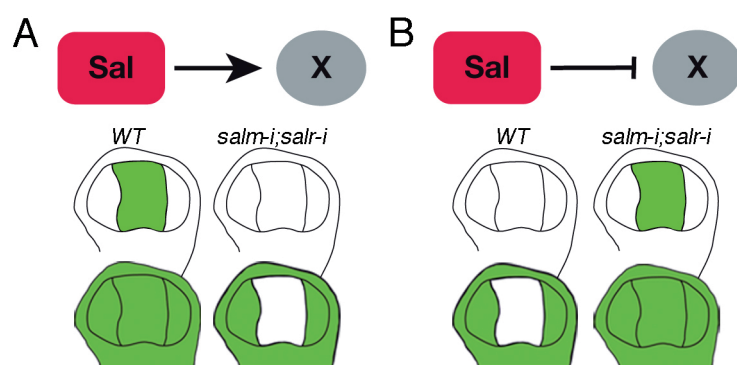
TABLA 1 UAS+ (Continuación)

Símbolo	CG	Plataforma	F. C.	p-value	Av. Signal	Clase Molec.
<i>TwdlE</i>	CG14534	A/I/O/A*	6,11	1,15E-09	1,61E+03	CG
<i>TwdlT</i>	CG5812	A/I/O/A*	3,53	2,19E-03	2,69E+02	CG
<i>TwdlV</i>	CG14640	A/I/O/A*	75,74	8,98E-09	6,57E+01	CG
<i>Ude</i>	CG18410	O	2,08	3,62E-02	4,09E+01	ADN
<i>unc-115</i>	CG31332	I	1,99	1,33E-03	1,65E+03	Cy
<i>vir-1</i>	CG31764	I/A*	3,81	2,86E-05	1,26E+02	CGh
<i>w</i>	CG2759	A/O/I	82,90	2,21E-13	4,49E+02	Sig
<i>Wnt4</i>	CG4698	I/O/A*	1,58	2,65E-03	2,99E+02	Sig
<i>wrapper</i>	CG10382	A*	1,06	2,83E-03	4,34E+03	CGh
<i>wun2</i>	CG8805	A/I/O/A*	2,79	1,72E-06	4,26E+02	Tr
<i>yellow-b</i>	CG17914	A/I/O	2,29	3,03E-06	4,38E+02	CGh
<i>yellow-e</i>	CG9792	A*	1,12	3,54E-03	7,46E+03	CGh
<i>yellow-e3</i>	CG17045	A/I/O/A*	3,84	1,88E-06	3,27E+02	CGh
<i>Zip3</i>	CG6898	A*	1,02	8,61E-02	6,48E+03	CG

**Tabla 1. Genes seleccionados mediante microarrays.** Genes que disminuyen y genes que aumentan su expresión en condiciones mutantes para *salM/salR* (DF- y DF+ respectivamente) y en condiciones de sobre-expresión de *salM* (UAS- y UAS+ respectivamente). Se indican la plataformas en la que fueron seleccionados: Affymetrix (A), Indac (I), Operon (O) y Affymetrix\* (A\*); los valores estadísticos de “Fold Change” (F. C.), p-value y “Average Signal” (Av. Signal), indicando el dato más representativo en el caso de los genes seleccionados en varias plataformas. Las clases moleculares (Clase Molec.) se muestran en la última columna: genes predichos sin homología (CG), genes predichos con homología (CGh), genes que codifican proteínas relacionadas con el ADN (ADN), señalización celular (Sig), adhesión celular (CA), genes que codifican proteínas relacionadas con modificaciones post-traduccionales (P), metabolismo (M), cutícula (Cut), genes que codifican proteínas relacionadas con el ARN (ARN), oxidación-reducción (RedOx), transporte (Tr), citoesqueleto (Cy), ribosoma (R), aparato de Golgi (Go), ARNs sin pauta de lectura (CR) y apoptosis (CD).

#### 4.2. Análisis de los patrones de expresión de los genes identificados en los experimentos de microarrays mediante hibridaciones *in situ*

La expresión de los genes *sal* está restringida a una región particular del ala, por lo que consideramos que los cambios globales de niveles de expresión detectados mediante microarrays podrían reflejar cambios en los dominios espaciales de expresión de los genes identificados. Para conocer el patrón de expresión de estos genes, así como su dependencia de la función de las proteínas Sal, realizamos un análisis individual de cada gen usando la técnica de hibridación *in situ*, que nos permite visualizar el dominio espacial de expresión de un ARNm. Este análisis se realizó tanto en organismos silvestres como en individuos en los que se reducen los niveles de expresión de *sal* mediante la técnica Gal4-UAS-ARN-i (*UAS-dicer; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+*). Nuestra hipótesis fue que los genes cuyo nivel de expresión cambia en respuesta a la falta o expresión ectópica de las proteínas Sal estarían regulados por estas proteínas en el ala. De esta manera la expresión de los genes cuya transcripción fuera activada por las proteínas Sal desaparecería de la región central del ala de discos mutantes para *sal* (Figura 37A). Por el contrario, los genes cuya transcripción en el dominio central del ala fuera reprimida por Sal no deberían expresarse en este dominio central en individuos silvestres y si lo harían en individuos *salm-i;salr-i* (Figura 37B).



**Figura 37. Esquema de activación y represión de la expresión génica mediada por Sal.** (A-B) Representación esquemática de un gen activado por Sal (A) o un gen reprimido por Sal (B) en la región central del ala. (A) Cambios de expresión esperados en la región central del ala de genes activados por Sal. Discos de la izquierda silvestres (WT) y discos de la derecha mutantes para *salm* y *salr* (*salm-i;salr-i*). (B) Cambios de expresión esperados en la región central del ala de genes reprimidos por Sal. Discos de la izquierda silvestres (WT) y discos de la derecha mutantes para *salm* y *salr* (*salm-i;salr-i*).

Estudiamos el patrón de expresión de aquellos genes cuyas proteínas pudieran estar relacionadas con las funciones identificadas para las proteínas Sal, incluyéndose las clases de regulación transcripcional (ADN), señalización celular (Sig), adhesión celular (CA) y metabolismo de proteínas (P). También se realizó la hibridación *in situ* de otros genes cuyos valores de “fold change”, p-value o “average signal” fueran máximos. En la Tabla 2 se muestran todos los genes seleccionados y en la Figura 38 los porcentajes de genes de cada clase molecular para los que se ha estudiado su patrón de expresión.



TABLA 2

Simbolo	CG	Condición	Plataforma	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>
<i>agt</i>	CG1303	DF+//UAS-	A*//A*	DNA	U+
<i>Ama</i>	CG2198	UAS-	A/I/O	CA	S=
<i>ana</i>	CG8084	UAS-	A/I/O/A*	Sig	SS-
<i>Ance</i>	CG8827	DF+	I/A	P	
<i>Arc1</i>	CG12505	DF-//UAS-	A/I//A*	DNA	N+
<i>b6</i>	CG3100	UAS+	A*	Sig	U-
<i>betaTub97EF</i>	CG4869	DF+	I	Sig	S-
<i>Blimp-1</i>	CG5249	UAS+	A*	DNA	U-
<i>BM-40-SPARC</i>	G6378	UAS-	I	CA	
<i>br</i>	CG11491	DF+	I/O	DNA	
<i>Brd</i>	CG3096	UAS-	I/O/A/A*	Sig	S=
<i>Cad86C</i>	CG42601/CG4655	UAS+	I/O/A*	CA	S-
<i>cer</i>	CG10460	UAS-	O/I/A	P	S
<i>CG10041</i>	CG10041	UAS+	I	P	U-
<i>CG10102</i>	CR10102/Arc3	UAS-	A*	CR	N+
<i>CG10176</i>	CG10176	UAS+	A	CG	U
<i>CG10916</i>	CG10916	DF+//UAS-	A*//A*	DNA	U+
<i>CG10962</i>	CG7090	DF-	A/I/A*	RedOx	U
<i>CG11034</i>	CG11034	DF+	A	P	U-
<i>CG11261</i>	CG11261	UAS-	I/A	P	
<i>CG11357</i>	CG11357	DF-	A/A*	P	U-
<i>CG11370</i>	CG11370	DF+	I	CG	S-
<i>CG11883</i>	CG11883	UAS-	A*	DNA	U-
<i>CG12129</i>	CG12129	DF-	I/O/A/A*	RNA	U=
<i>CG12182</i>	CG12182	DF+	A/I	CGh	U
<i>CG12256</i>	CG12256	UAS+	A*	P	U-
<i>CG1273</i>	CG1273	UAS+	I/O/A*	CG	S-
<i>CG12926</i>	CG12926	DF+	O/I	Tr	U
<i>CG1344</i>	BcDNA:LD22679	DF-	O	P	
<i>CG13618</i>	CG13618	UAS+	A*	CGh	U-
<i>CG13850</i>	CG13850	UAS+	A	P	U-

TABLA 2 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Plataforma	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>
CG14120	CG14120	DF-	O	DNA	
CG14341	CG14341	DF-	O/I	CG	U
CG14470	CG14470	UAS+	A/I/A*	P	S=
CG14590	CG14590	UAS+	A	DNA	U-
CG14598	CG14598	UAS+	A*	CG	S=
CG14636	CG14636	UAS-	A/O/A*	CG	U=
CG14869	CG6107	DF+	A	P	U-
CG15046	CG15046	UAS+	I/O	P	
CG15117	CG15117	DF-	A	P	
CG15212	CG15212	DF-//UAS-	I/O/A*//I/O/A	CG	S-
CG15282	CG15282	UAS-	A/I/A*	CG	U=
CG15369	CG15369	DF+	O/I	P	U-
CG1572	CG1572	UAS+	A/O/I	CGh	U=
CG15739	CG15739	DF-	O	P	U-
CG15784	CG15784	DF-//UAS-	A/I/O//A*	CG	S+
CG1600	CG1600	UAS+	I/A/O	RedOx	U
CG16704	CG16704	DF+	I/O	P	N
CG16712	CG16712	DF+	O/I	P	U-
CG16713	CG16713	DF+	I/O	P	N=
CG16756	CG16756	DF-	O	P	U-
CG16884	BG:DS00180.3	UAS-	O/A*	CG	SS-
CG16885	CG16885	UAS-	I/A*	CG	SS-
CG16947	CG16947	DF-//UAS-	I//I/A*	CGh	U-
CG17018	CG17018	UAS+	A*	RNA	N=
CG17278	CG17278	UAS-	A*	Sig	SS=
CG17352	CG17352	DF+	A/O/I/A*	CGh	N=
CG17684	CG17684	UAS-	A*	P	U=
CG17698	CG17698	UAS-	O/I	P	
CG18213	CG18213	DF-//UAS-	A/I//A/A*	CGh	N+
CG18316	CG18316	DF-	O/I/A	CG	U=
CG18522	CG18522	DF-//UAS-	A/O//A*	RedOx	N+

TABLA 2 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Plataforma	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>
CG18563	CG18563	UAS-	O	P	N=
CG18600	CG18600	UAS-	A/I	DNA	
CG18853	CG18853	UAS+	I/O	DNA	
CG2145	CG2145	UAS-	A/I/O	P	U-
CG2177	CG2177	DF+//UAS+	I/A//I/A*	Tr	N=
CG2201	CG2201	DF+	I/A	P	
CG2233	CG2233	DF+	I/O	CG	U
CG2909	CG2909	DF-	O/I/A	CG	U
CG30069	CG13017	DF-	A/O/I	CG	SS-
CG3008	CG3008	UAS-	A*	P	U+
CG30101	CG30101	UAS+	A*	CG	S-
CG30196	CG30196	DF-//UAS-	I//A*	Sig	N+
CG30217	CG13514	DF-//UAS-	A/I//A*	Sig	S-
CG30359	CG30359	DF+	I	M	U
CG30428	CG30428	DF+//UAS+	A/I//A*	CG	U
CG3097	CG3097	UAS+	I/O/A*	P	U-
CG31098	CG10634	DF-//UAS-	I/A//I/A*	P	U-
CG31612	CG11631	DF-	A*	CGh	N=
CG31672	CG4248	DF-	A/I/A*	CG	U-
CG31698	CG31698	DF+	I	CG	U
CG31705	CG31705	UAS+	A*	CG	S+
CG32055	CG32055	DF-//UAS-	I/A/A*//I/A*	Sig	SS-
CG32278	CG12032	UAS-	I/O	CG	N
CG32364	CG32364	UAS-	I/O/A*	DNA	U-
CG32372	CG7545	DF-//UAS-	A/I/A*//A/I	CGh	SS=
CG32373	CG32373	UAS-	A/I/O/A*	Sig	SS=
CG32412	CG10487	DF-//UAS+	A//I	P	U
CG32850	CG32850	DF+//UAS+	A//A*	CGh	S-
CG33205	CG8154	DF-	I/A/O	P	S-
CG33960	CG33960	UAS-	A*	Sig	U-
CG33970	CG31085/CG6162	UAS-	A/I/A*	Tr	SS-

TABLA 2 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Plataforma	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>
CG34406	CG3485	UAS-	A*	DNA	U-
CG3726	CG3726	UAS-	A*	DNA	S-
CG3837	CG3837	UAS+	A/O/I/A*	Sig	
CG3857	CG3857	UAS-	I/A/A*	CG	U=
CG40006	CG40006	UAS-	A/O/A*	CA	U-
CG42319	CG17041	DF-	O	P	
CG4398	CG4398	UAS-	A/O	Sig	U-
CG4409	CG4409	DF-//DF+//UAS-	A/I//A*//A*	CG	N=
CG4565	CG4565	UAS+	A*	DNA	U-
CG4928	CG4928	DF+	I	CGh	U
CG4998	CG4998	UAS+	I/A*	P	N
CG5391	CG5391	DF+	A*	CG	N=
CG5535	CG5535	DF-//UAS-	I/A//A/I/A*	Tr	U
CG5830	CG5830	DF+	O/I	M	U
CG5958	CG5958	DF+	I	Tr	U
CG6013	CG6013	DF+	O/A	DNA	U
CG6272	CG6272	DF-//UAS-	A/I//A*	DNA	N+
CG6357	CG6357	DF+//UAS+	O/A/I//I/O/A*	P	S-
CG6654	CG6654	UAS+	I/A/O	DNA	U-
CG6701	CG6701	DF+//UAS+	I/A//I/A/A*	DNA	U-
CG7080	CG7080	DF+//UAS-	A*//A*	CG	U-
CG7173	CG7173	UAS+	A*	P	S-
CG7201	CG7201	UAS-	I/O/A*	CG	SS-
CG7224	CG7224	UAS-	O	CG	U
CG7420	CG7420	DF-	I	DNA	U-
CG7787	CG7787	UAS-	A	Sig	
CG7906	CG7906	DF+	A	P	U-
CG8172	CG8172	UAS+	A*	P	S-
CG8317	CG8317	UAS-	I/O	CG	S
CG8503	CG8503	DF+	O/I	DNA	
CG8675	CG8675	DF-	A/I	CG	U-

TABLA 2 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Plataforma	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>
<i>CG8773</i>	<i>CG8773</i>	UAS+	A	P	U-
<i>CG8945</i>	<i>CG8945</i>	DF+	A*	P	U-
<i>CG8965</i>	<i>CG8965</i>	DF-	A/A*	Sig	S-
<i>CG9238</i>	<i>CG9238</i>	UAS+	A/A*	P	N=
<i>CG9662</i>	<i>CG9662</i>	UAS-	A	M	U
<i>CG9747</i>	<i>CG9747</i>	UAS+	I/O/A*	RedOx	S=
<i>CG9850</i>	<i>CG11169</i>	DF+//UAS-	A*//A/A*	P	SS-
<i>Chrac-16</i>	<i>CG15736</i>	DF-	A/I	DNA	
<i>Cht7</i>	<i>CG1869</i>	DF-	A	Cut	SS-
<i>Cirl</i>	<i>CG8639</i>	UAS+	A*	Sig	U-
<i>Clect27</i>	<i>CG3244</i>	DF+//UAS-	A*//A*	CGh	S-
<i>Clic</i>	<i>CG10997</i>	DF-//UAS+	I//I/A	M	U
<i>Cpr49Ah</i>	<i>CG8515</i>	UAS+	A/I/O	Cut	S=
<i>Cpr66D</i>	<i>CG32029</i>	DF-//UAS+	A/I//A/I/O	Cut	U-
<i>Cpr72Ea</i>	<i>CG4818</i>	DF-//UAS+	O//A/I/O/A*	Cut	U
<i>CR43361</i>	<i>CG32021</i>	DF-//UAS-	A/I//A*	CG	N+
<i>cul-2</i>	<i>CG1512</i>	UAS-	A*	P	N+
<i>Cyp18a1</i>	<i>CG6816</i>	UAS+	I/A/O/A*	RedOx	U
<i>Cyp6a17</i>	<i>CG10241</i>	DF+//UAS-	A/I//A/O/A*	RedOx	N
<i>Cyp6d2</i>	<i>CG4373</i>	UAS-	I/A*	RedOx	U
<i>dap</i>	<i>CG1772</i>	UAS+	I/O	M	N
<i>daw</i>	<i>Alp23B/CG16987</i>	UAS+	I/A/O/A*	Sig	S-
<i>Dip2</i>	<i>CG9771</i>	UAS-	A/O/I	DNA	
<i>DI</i>	<i>CG3619</i>	UAS-//UAS+	I//A/I	Sig	SS+
<i>dlg1</i>	<i>CG1725</i>	DF-	O	Sig	U-
<i>Doc1</i>	<i>CG5133</i>	UAS-	A/I/O/A*	DNA	SS=
<i>Doc2</i>	<i>CG5187</i>	UAS-	A/I/O/A*	DNA	SS=
<i>dpr19</i>	<i>CG13140</i>	DF-	A*	CGh	N=
<i>Dscam4</i>	<i>CG42330</i>	UAS-	A*	CGh	S-
<i>Dsno</i>	<i>CG34421/SD06617</i>	UAS+	A*	Sig	U-
<i>dve</i>	<i>CG5799</i>	UAS-	I/O/A*	DNA	SS=

TABLA 2 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Plataforma	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>
<i>dy</i>	CG9355	UAS+	A/I/A*	Cut	U-
<i>Ect4</i>	CG34373/CG13680	UAS-	I/O	Sig	U-
<i>Eig71Ee</i>	CG7604	DF+	I	Cut	N
<i>emc</i>	CG1007	UAS+	O/I	DNA	
<i>escl</i>	CG5202	UAS-	A*	DNA	U+
<i>esn</i>	CG12833	UAS+	O/A	CGh	S-
<i>Ets21C</i>	CG2914	UAS+	A*	DNA	S-
<i>Fbp1</i>	CG17285	DF+	I/O	Tr	U
<i>Fbp2</i>	CG3763	DF+	I	RedOx	U
<i>fon</i>	CG15825	DF+	I/O	CGh	U
<i>fru</i>	CG14307	UAS-	A*	DNA	U-
<i>fs(1)Yb</i>	CG2706	DF+//UAS-	A*//A*	DNA	U-
<i>GABA-B-R1</i>	CG15274	DF-	A	Sig	
<i>gkt</i>	CG8825	DF+//UAS-	A/I//A*	CGh	U=
<i>gp210</i>	CG7897	DF-	A	Sig	U-
<i>Gr61a</i>	CG13888	UAS-	O/A*	Sig	
<i>Gr64a</i>	CG32261	UAS-	A*	Sig	U-
<i>GstE1</i>	CG5164	DF-//UAS-	I/A//I/A*	RedOx	U
<i>H2.0</i>	CG11607	UAS-	I	DNA	U-
<i>His1:CG31617</i>	CG31617	DF+//UAS+	I/A//I/O	DNA	S=
<i>His2A</i>	CG31618	UAS-	A*	DNA	S=
<i>His4:CG31611</i>	CG31611	DF-//UAS-	I/A//A/I/A*	DNA	S=
<i>Hsp26</i>	CG4183	DF+	I	P	
<i>Hsp67Bb/HsP22</i>	CG32041	UAS+	I	P	
<i>Hsp67Bc</i>	CG4190	UAS+	I	P	
<i>Idgf4</i>	CG1780	DF+//UAS+	I/O//I/A/O	Sig	U-
<i>ImpE1</i>	CG32356	DF+//UAS-	A/I//I	CGh	S=
<i>ImpL2</i>	CG15009	UAS+	I/A/O/A*	CA	S+
<i>Irpb</i>	CG5247	UAS-	A*	DNA	U+
<i>kay</i>	CG33956	UAS+	I/O	DNA	
<i>l(2)03659</i>	CG8799	DF+//UAS-	A*//A*	Tr	U-

TABLA 2 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Plataforma	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>
<i>l(2)06496</i>	CG9893	DF-//UAS-	A/I//A/I	Cy	S
<i>l(2)34Fc</i>	CG7532	UAS-	A*	P	U-
<i>l(3)S147910/ver</i>	CG14121	DF-//DF+//UAS-	O/I//A*//A*	DNA	U+
<i>LBR</i>	CG17952	UAS+	O/I	CGh	U
<i>lilli</i>	CG8817	DF-	I	DNA	
<i>lola</i>	CG12052	UAS+	I	DNA	U-
<i>Lsp2</i>	CG6806	DF+	I	Tr	N
<i>m4</i>	CG6099	UAS-	A/I/O/A*	Sig	S-
<i>mbl</i>	CG33197	DF+//UAS-	A/I//A*	DNA	U-
<i>miple</i>	CG1221	DF-//UAS-	I/O/A//I/O	Sig	U-
<i>mirr</i>	CG10601	UAS+	I/A/O	DNA	
<i>mod(mdg4)</i>	CG32491	DF-	I	DNA	U-
<i>moody</i>	CG4322	UAS+	A/A*	Sig	U-
<i>mre11</i>	CG16928	DF+//UAS-	A*//A*	DNA	N+
<i>Msh6</i>	CG7003	DF-//UAS-	A/A	DNA	S=
<i>mthl4</i>	CG6536	DF+	A/I/A*	Sig	U=
<i>mthl8</i>	CG32475	DF-	A/O/I	Sig	U-
<i>mus205</i>	CG1925	DF+	A*	DNA	U+
<i>nab</i>	CG15000	UAS-	I/O/A*	DNA	SS=
<i>NC2</i>	CG10318	UAS+	A	DNA	
<i>Nep1</i>	CG5905	UAS-	I/O/A*	P	S=
<i>net</i>	CG11450	DF-//UAS-	A/I//O	DNA	
<i>NetA</i>	CG18657	UAS+	A*	CGh	SS-
<i>nimB2</i>	CG31839	DF+	I	Sig	U-
<i>nod</i>	CG1763	UAS+	A*	DNA	U-
<i>Nos</i>	CG6713	DF-	A	DNA	U-
<i>Npc2b</i>	CG3153	UAS+	A/I/O/A*	CA	S=
<i>NT1</i>	CG42576/CG32242	UAS+	A/A*	CD	S-
<i>ntc</i>	CG10855	DF+	A/I	P	
<i>nub</i>	CG34395	UAS-	I/A/O/A*	DNA	
<i>Obp56a</i>	CG11797	UAS-	I/A/O	Sig	U-



TABLA 2 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Plataforma	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>
<i>Obp56d</i>	CG11218	DF+	I	Sig	
<i>Obp99b</i>	CG7592	DF+	I	Sig	N
<i>Obp99c</i>	CG7584	DF+	I	Sig	
<i>obst-B</i>	CG4778	DF-	A/I	Cut	N
<i>odd</i>	CG3851	UAS+	I/O	DNA	S
<i>opa</i>	CG1133	UAS-	A/O/I/A*	DNA	S-
<i>Optix</i>	CG18455	DF+//UAS-	A/O/I//A/I/O/A*	DNA	SS+
<i>Orct</i>	CG6331	DF+	I/O	Tr	U
<i>Oseg5</i>	CG9333	DF+	A/A*	Cy	U-
<i>Osi14</i>	CG1155/Sp558	DF-//UAS-	I/O//A*	CG	S=
<i>pdm2</i>	CG12287	UAS-	I/A/O/A*	DNA	U-
<i>PGRP-LC</i>	CG4432	DF+	A/I/A*	DNA	U-
<i>Phk-3</i>	CG9358	UAS+	I/A	Sig	S=
<i>phr</i>	CG11205	DF+//UAS+	A//A*	DNA	U-
<i>phr6-4</i>	CG2488	DF-	A*/I	DNA	U-
<i>pinta</i>	CG13848	DF+//UAS+	I/A//A/I/A*	M	U-
<i>pio</i>	CG3541	DF+	I	Cut	S
<i>Pka-C1</i>	CG4379	UAS+	A*	Sig	U-
<i>pnt</i>	CG17077	DF+//UAS+	O/A//A*	DNA	U-
<i>Poxn</i>	CG8246	UAS-	O/I	DNA	
<i>ppk20</i>	CG7577	DF-//UAS-//UAS+	A*//A/I//A*	Tr	U-
<i>pst</i>	CG8588	UAS+	A/I/O/A*	M	U=
<i>Ptpa</i>	CG3289	DF+	O	Sig	U-
<i>Ptr</i>	CG11212	UAS+	A*	Sig	U-
<i>Rad1</i>	CG3240	DF-	I	DNA	U-
<i>Rala</i>	CG2849	UAS-	A/I	Sig	S
<i>RanBP3</i>	CG10225	DF+	I	Sig	U-
<i>rec</i>	CG31293	DF+	I	DNA	
<i>rev7</i>	CG2948	UAS-	A	DNA	U-
<i>RfaBp</i>	CG11064	DF+	I	Tr	U
<i>robo</i>	CG13521	UAS-	I/A	CA	

TABLA 2 (Continuación)

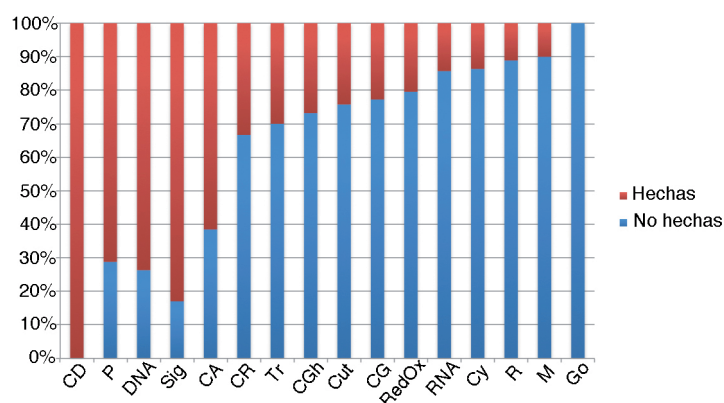
Simbolo	CG	Condición	Plataforma	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>
<i>rols</i>	CG32096	UAS+	A/I	CA	
<i>RpL27</i>	CG4759	DF+//UAS+	I//I/O	R	U
<i>Rpt3R</i>	CG9475	DF+	A/I/A*	P	U
<i>sage</i>	CG12952	DF+	I	DNA	U-
<i>sala</i>	CG4922	DF+	A/O/I/A*	CG	U
<i>salm</i>	CG6464	DF-//UAS-//UAS+	A/I/A*//A/I/A*//O	DNA	
<i>salr</i>	CG4881	DF-//UAS-	A/I//A/I/O/A*	DNA	
<i>scaf</i>	CG11066	UAS+	I/O/A*	P	S=
<i>SCAP</i>	CG33131	DF-	A/A*	P	U=
<i>scb</i>	CG8095	UAS+	A/I/A*	CA	U+
<i>scrib</i>	CG42614	UAS+	O	CA	U-
<i>sda</i>	CG5518	UAS-	I/A/O	P	U
<i>sens</i>	CG32120	UAS-	A*	DNA	S=
<i>shn</i>	CG7734	UAS+	A*	DNA	U-
<i>slow</i>	CG7447	DF+//UAS+	A/O//I/O/A*	CA	
<i>sob</i>	CG3242	UAS+	A/O/A*	DNA	S=
<i>Sox14</i>	CG3090	DF+	I	DNA	
<i>SoxN</i>	CG18024	DF+	O/I	DNA	U-
<i>SP1029</i>	CG11956	DF+	I/O	P	
<i>SPE</i>	CG16705	DF+	A	P	U-
<i>spirit</i>	CG2056	DF+	A	P	U-
<i>Spn100A</i>	CG1342	DF+//UAS+	A//A*	P	SS-
<i>Spn28D</i>	CG7219	DF+	A/I	P	
<i>Spn42De</i>	CG9460	DF+	A/A*	P	U-
<i>Spn43Aa</i>	CG12172	UAS+	A/O/I/A*	P	S-
<i>Spn43Ab</i>	CG1865	DF+	I/O	P	U
<i>Spn47C</i>	CG7722	UAS-	A*	P	U-
<i>Spt-I</i>	CG4016	UAS-	A/I	P	
<i>spz</i>	CG6134	DF+	I/O	Sig	U-
<i>Strn-Mlck</i>	CG18255	DF+	I	P	U-
<i>stv</i>	CG32130/CG10745	DF-//UAS+	A//A	P	

TABLA 2 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Plataforma	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>
<i>swi2</i>	CG14485	DF-//UAS+	A*//A*	Sig	U-
<i>SytIV</i>	CG10047	DF+//UAS+	A/I//A*	Tr	N=
<i>tej</i>	CG8589	UAS+	A	DNA	U-
<i>TepIV</i>	CG10363	UAS-	I/A/O	P	
<i>tey</i>	CG8780	UAS-	A/O/A*	DNA	U-
<i>Tie</i>	CG7525	UAS-	A	P	
<i>Tig</i>	CG11527	DF+	O	CA	
<i>Timp</i>	CG6281	UAS+	A/I/O/A*	CA	S=
<i>Trim9</i>	CG31721/CG6256	UAS-	I/A*	CGh	SS-
<i>trio</i>	CG18214	UAS+	A/I	Sig	
<i>Trx-2</i>	CG31884	UAS-	I/O	DNA	U-
<i>TwdIE</i>	CG14534	UAS+	A/I/O/A*	CG	U
<i>Ubp64E</i>	CG5486	UAS-	A*	P	
<i>Ubqn</i>	CG14224	UAS-	I/O	P	U=
<i>Ude</i>	CG18410	UAS+	O	DNA	U-
<i>unc-115</i>	CG31332	UAS+	I	Cy	U
<i>unc-13</i>	CG2999	DF-//UAS-	I/O/A//A*	Sig	S+
<i>vir-1</i>	CG31764	DF-//UAS+	I//I/A*	CGh	SS-
<i>vvl</i>	CG10037	UAS-	A/I	DNA	
<i>w</i>	CG2759	UAS+	A/O/I	Sig	
<i>Wnt4</i>	CG4698	UAS+	I/O/A*	Sig	S-
<i>wrapper</i>	CG10382	UAS+	A*	CGh	U-

**Tabla 2. Genes seleccionados para analizar su patrón de expresión.** Tipos de expresión en discos imaginales silvestres y/o mutantes para los genes *sal*. Genes que no se expresan (N), que se expresan ubicuamente (U), que presentan un patrón de expresión restringido a alguna región del disco imaginal de ala (S) y que muestran un patrón de expresión restringido a la región de ala (SS). Los signos + y - indican que la expresión aumenta (+) o disminuye (-) en discos imaginales mutantes para los genes *sal*, y el signo = indica que no varía la expresión. DF- y DF+: genes que disminuyen o aumentan su expresión en condiciones de falta y exceso de *sal*, UAS- y UAS+: genes que disminuyen o aumentan su expresión en condiciones de sobre-expresión de *sal/m*, A: Affymetrix, I: Indac, O: Operon y A\*: Affymetrix\*. Las clases moleculares (Clase Molec.) de cada gen son: genes predichos sin homología (CG), genes predichos con homología (CGh), genes que codifican proteínas relacionadas con el ADN (ADN), señalización celular (Sig), adhesión celular (CA), genes que codifican proteínas relacionadas con modificaciones post-traduccionales (P), metabolismo (M), cutícula (Cut), genes que codifican proteínas relacionadas con el ARN (ARN), oxidación-reducción (RedOx), transporte (Tr), citoesqueleto (Cy), ribosoma (R), aparato de Golgi (Go), ARNs sin pauta de lectura (CR) y apoptosis (CD).

A



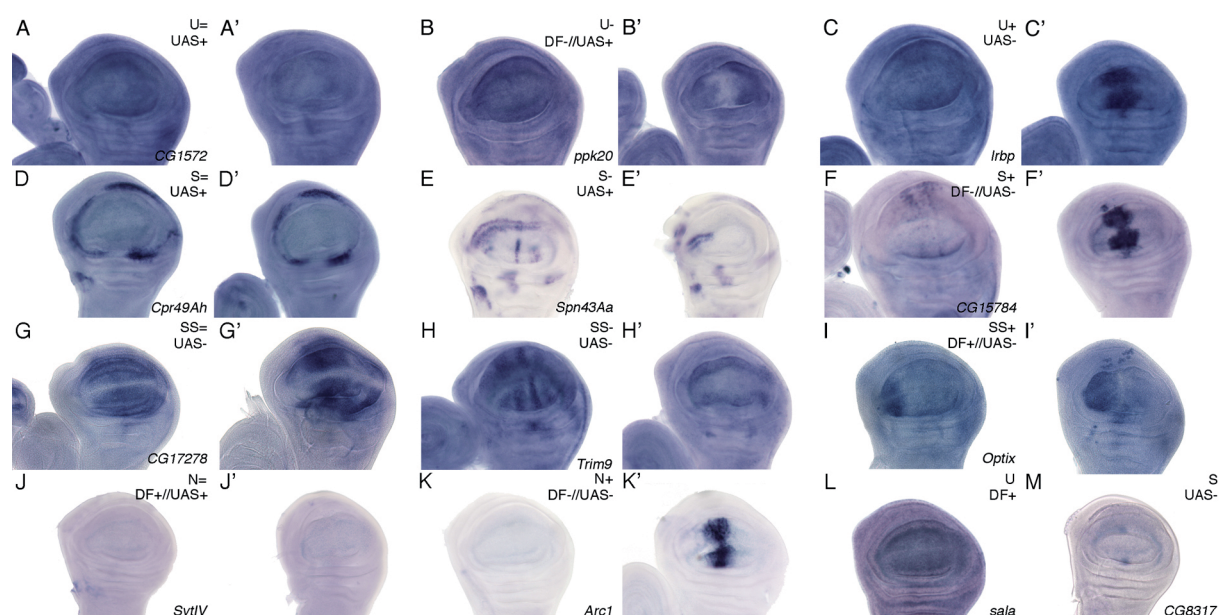
**Figura 38. Porcentaje de genes analizados por hibridación *in situ* con respecto a la clase molecular de cada gen.** Las barras indican el porcentaje de hibridaciones *in situ* hechas (rojo) y no hechas (azul) de cada clase molecular (eje X).

Seguindo los criterios comentados anteriormente, se seleccionaron 301 genes, para los cuales se realizaron hibridación *in situ* en 197 casos en discos imaginales de ala silvestres y en discos imaginales de ala en los que reducimos la expresión de *sal* y *salr* utilizando la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* (Figura 8E). Para otros 52 genes se analizó su patrón de expresión en discos imaginales de ala de individuos silvestres, y en los 52 genes restantes no se pudo estudiar el patrón de expresión debido a diferentes problemas metodológicos.

Los patrones de expresión de los genes analizados se clasificaron en los siguientes grupos: N (no presenta expresión en el disco imaginal de ala), U (presenta una expresión ubicua en todo el disco imaginal de ala), S (patrón de expresión restringido a alguna región del disco imaginal de ala) y SS (patrón de expresión restringido con respecto a la región central del ala). A esta clasificación hemos añadido los signos "+", "-" e "=", para indicar que la expresión del gen aumenta (+), disminuye (-) o permanece sin cambios (=) en individuos mutantes para los genes *sal*. Los resultados numéricos globales obtenidos se indican a continuación:

<b>N</b>	9	<b>S</b>	6	<b>U</b>	37	<b>SS</b>	0
<b>N=</b>	11	<b>S=</b>	19	<b>U=</b>	12	<b>SS=</b>	7
<b>N-</b>	0	<b>S-</b>	24	<b>U-</b>	88	<b>SS-</b>	13
<b>N+</b>	9	<b>S+</b>	4	<b>U+</b>	8	<b>SS+</b>	2

En la Figura 39 se puede observar un ejemplo de cada una de las categorías. El resto de hibridaciones *in situ* se muestran agrupadas por categorías en las Figuras Suplementarias 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

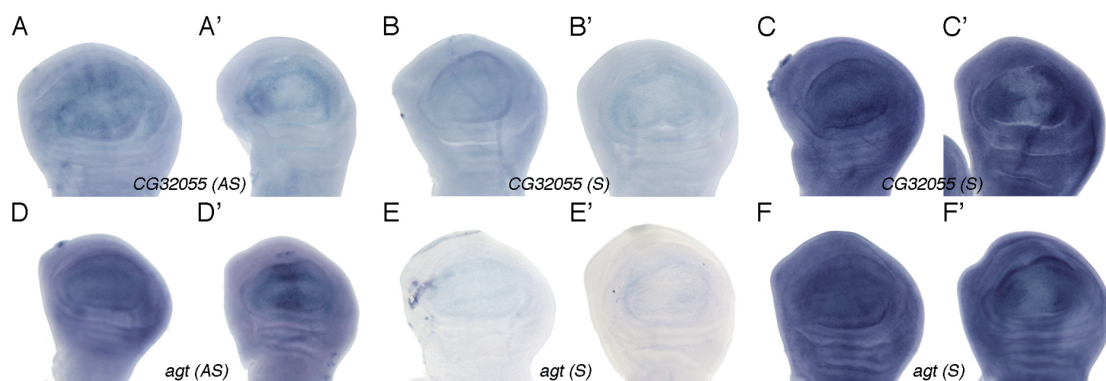
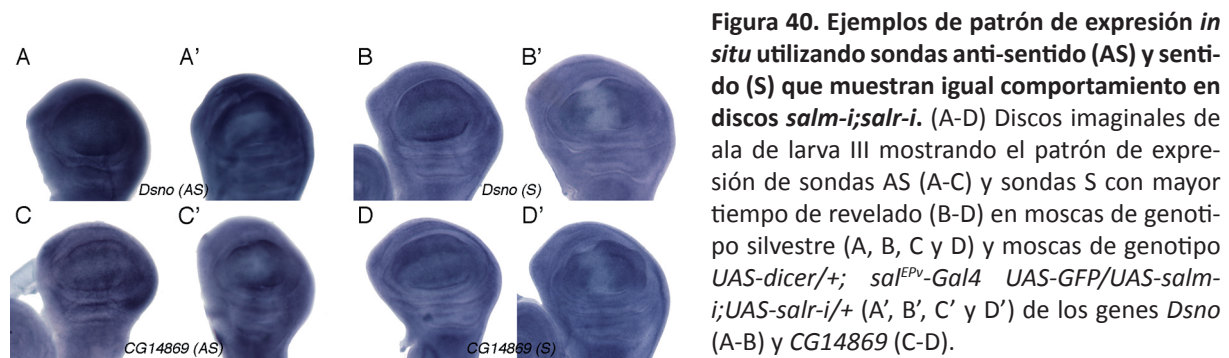


**Figura 39. Ejemplos de patrones de expresión de genes cuya expresión varía en ausencia de los genes *sal* mediante el uso de hibridación *in situ*.** (A-M) Discos imaginales de ala de larva III mostrando el patrón de expresión de sondas anti-sentido (AS) en fondo genético silvestre (A-M) y en discos de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (A'-K'). En cada imagen se muestra arriba a la derecha la categoría de patrón de expresión a la que pertenece cada gen (U=, U-, U+, S=, S-, S+, SS=, SS-, SS+, N=, N+, U y S) y el microarray dónde fue identificado (DF-, DF+, UAS- y UAS+). Abajo a la derecha se indica el nombre del gen estudiado.

Los genes que presentan una disminución en su expresión al reducir la expresión de las proteínas Sal, es decir, los genes de las categorías S-, U- y SS-, serían los candidatos a ser activados por dichas proteínas, forman un grupo de 125 genes. Los genes cuya expresión aumenta en ausencia de las proteínas Sal, incluidos en las categorías N+, S+, U+ y SS+, serían los candidatos a ser reprimidos por Sal en la región central del ala, en total son 23.

Se puede resaltar que el número de genes que serían activados por las proteínas Sal, 125, es mucho mayor que el de genes reprimidos, 23. Este resultado se debe en gran parte al elevado número de genes que, expresándose ubicuamente por todo el disco de ala, presentan una disminución en la región central del ala al reducir la expresión de los genes *sal*, (U-, n= 88). También contribuye significativamente el alto número de genes que presentan un patrón de expresión restringido en el disco imaginal de ala y cuya expresión disminuyen en la región central de individuos mutantes *sal/salr* (S-, n= 24). La bajada de expresión que observamos en los genes de clasificación U- y S- podría ser debida a que el dominio central del ala está muy reducido en tamaño y número de células, debido a las funciones de Sal en el mantenimiento de la integridad epitelial, en la progresión del ciclo celular y en prevenir apoptosis. Realizamos hibridaciones *in situ* de la sonda sentido de 34 de estos genes y observamos que, prolongando el tiempo de revelado, obteníamos una señal generalizada en todo el disco imaginal de ala con una disminución en la región central, reminiscente de los patrones de expresión U- (Figura 40)

y de algunos S-. También realizamos hibridaciones *in situ* con la sonda sentido de 23 genes pertenecientes a todas las categorías de patrones de expresión encontradas, sin observarse ningún patrón de expresión al parar el revelado de la hibridación *in situ* en el momento que aparecía el patrón de expresión de la sonda antisentido (Figura 41). Con estos datos, no podemos concluir que las proteínas Sal están reprimiendo la expresión de los genes U- y de algunos de los genes S-, debido a que también observamos este comportamiento en hibridaciones *in situ* de sondas sentido. Por tanto, estos genes no han sido considerados como candidatos a ser regulados por las proteínas Sal.



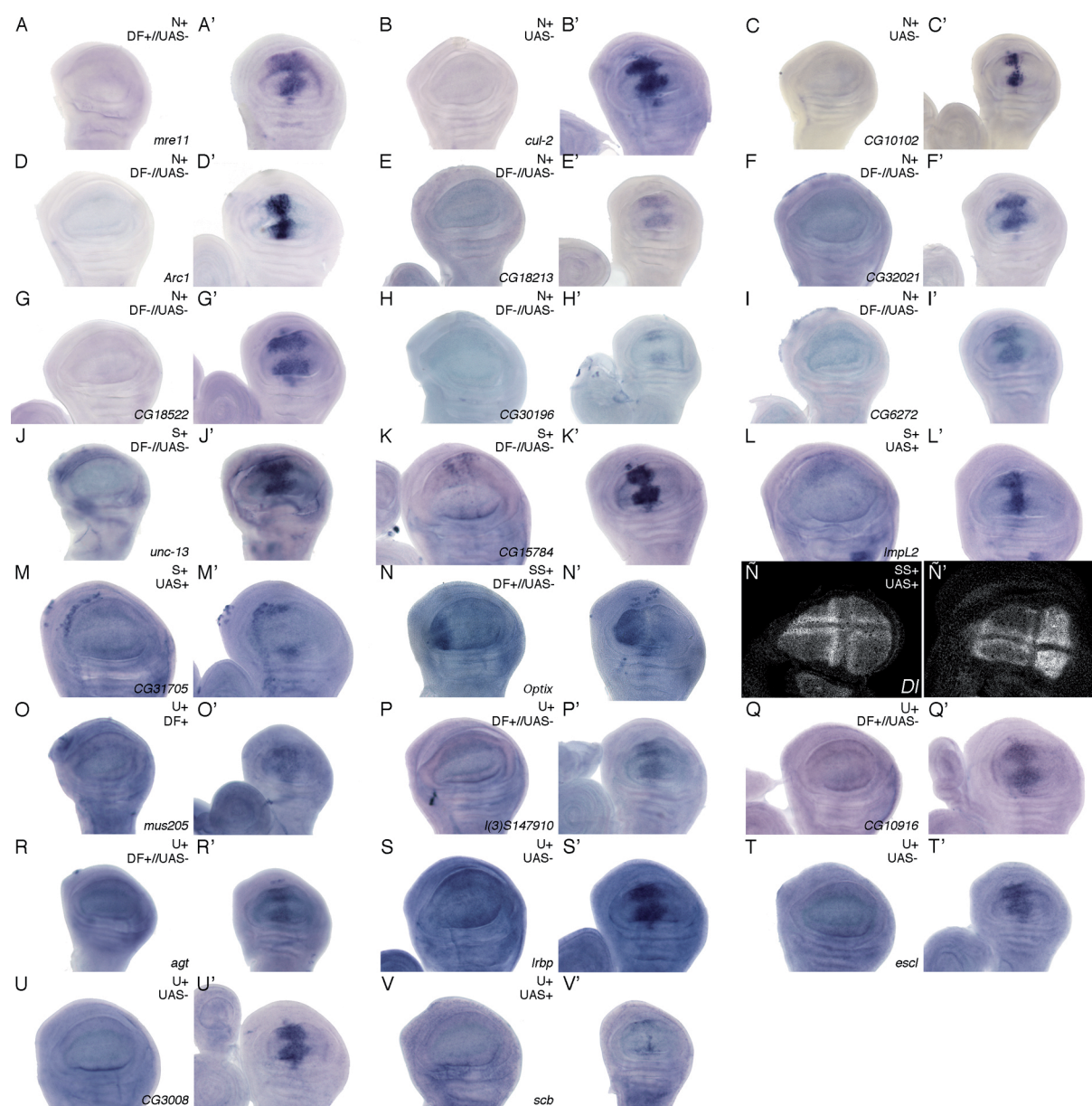
**Figura 41. Ejemplos de hibridaciones *in situ* de sondas anti-sentido (AS) y sentido (S) que muestran diferencias en sus patrones de expresión.** (A-C) Discos imaginales de ala de larva III mostrando el patrón de expresión de sondas AS (A-A'), de sonda S (B-B') y de sonda S con mayor tiempo de revelado (C-C') del gen *CG32055* en moscas de genotipo silvestre (A, B, C) y moscas de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+* (A', B', C'). (D-F) Discos imaginales de ala de larva III mostrando el patrón de expresión de sondas AS (D-D'), de sonda S (E-E') y de sonda S con mayor tiempo de revelado (F-F') del gen *agt* en moscas de genotipo silvestre (D, E, F) y moscas de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+* (D', E', F').

Para determinar si existe una relación directa entre los datos obtenidos en los microarrays y los datos de expresión *in situ* se compararon ambos, y se encontró una relación muy baja. En la tabla que se muestra a continuación se indican dichas comparaciones:

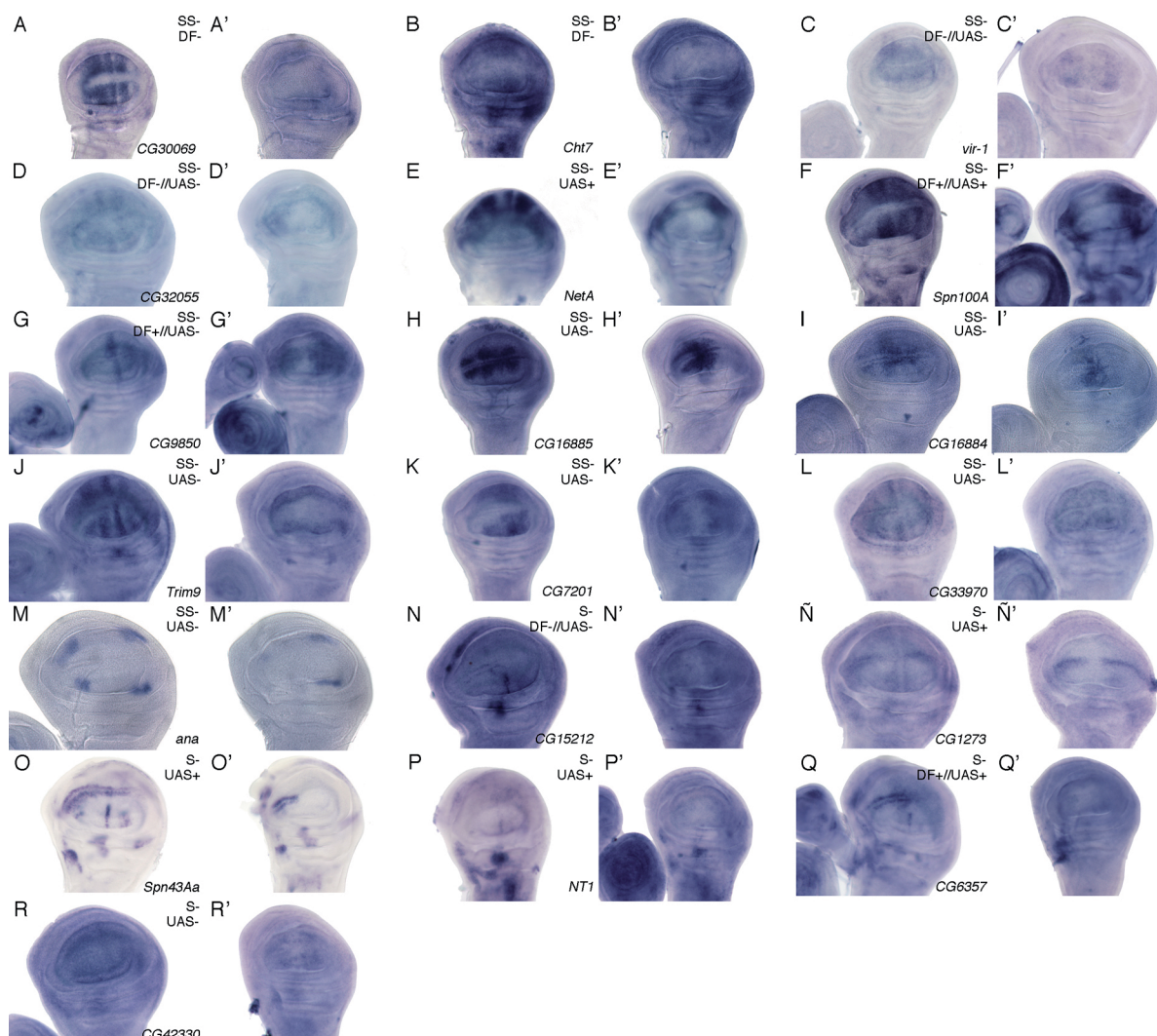
	n	¿?	=	+	-
<b>DF-</b>	139	93	10	9	27
<b>DF+</b>	189	139	10	6	34
<b>UAS-</b>	205	121	24	19	41
<b>UAS+</b>	239	171	16	4	48

En primer lugar, encontramos una fracción de genes obtenidos en las condiciones DF-, DF+, UAS- y UAS+ que al analizar su patrón de expresión mediante hibridación *in situ* en fondo mutante *salm/salr* y en individuos silvestres no presenta cambios (columna “=”). Por otro lado, en el grupo de genes cuyos niveles de expresión aumentan al eliminar los genes *sal* (DF+), encontramos 34 que pertenecen a las categorías U- y S-, y sólo 6 en las categorías U+, S+ y SS+. En el grupo de genes cuyos niveles de expresión disminuyen en discos mutantes para *sal/salr* (DF-), encontramos 27 genes que pertenecen a las categorías U- y S-, y 9 a las categorías U+, S+ y SS+. Estos datos nos indican que los valores numéricos obtenidos en los experimentos de microarrays no siempre corresponden con las observaciones directas de los patrones de expresión *in situ*. Para definir con mayor precisión los genes candidatos a ser regulados por Sal/Salr, hemos dado más valor a los datos de hibridación *in situ*, y éstos nos han permitido identificar un total de 42 genes, de los que 23 estarían reprimidos por Sal/Salr (Figura 42) y 19 serían activados por estas proteínas (Figura 43).





**Figura 42. Patrones de expresión de genes candidatos a ser reprimidos por las proteínas Sal.** (A-V) Discos imaginales de ala de larva III mostrando el patrón de expresión de sondas anti-sentido (AS) en moscas de genotipo silvestre (A-V) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+* (A'-V'). Arriba y a la derecha de cada pareja de discos se muestra la categoría de patrón de expresión a la que pertenece (U=, U-, U+, S=, S-, S+, SS=, SS-, SS+, N=, N+, U y S) y el microarray dónde se identificaron los genes (DF-, DF+, UAS- y UAS+). Abajo y a la derecha se indica el gen del cual se muestran los patrones de expresión.



**Figura 43. Patrones de expresión de genes candidatos a ser activados por las proteínas Sal.** (A-R) Discos imaginales de ala de larva III mostrando el patrón de expresión de sondas anti-sentido (AS) en moscas de genotipo silvestre (A-R) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (A'-R'). Arriba y a la derecha de cada pareja de discos se muestra la categoría de patrón de expresión a la que pertenece (U=, U-, U+, S=, S-, S+, SS=, SS-, SS+, N=, N+, U y S) y el microarray dónde se identificaron los genes (DF-, DF+, UAS- y UAS+). Abajo y a la derecha se indica el gen del cual se muestran los patrones de expresión.

#### 4.3. Estudio de regiones reguladoras mediante análisis bioinformático

Suponiendo que las proteínas Sal funcionan como un factor de transcripción convencional, podemos esperar que esta función se realizara mediante su unión a secuencias específicas del ADN. Sin embargo, no se conoce con detalle a qué secuencias se unen estas proteínas, lo que dificulta cualquier análisis bioinformático de predicción de regiones diana para Sal en los genes candidatos a ser regulados por estas proteínas. Utilizando la información disponible sobre los sitios de unión al ADN de las proteínas Sal, tanto en vertebrados como en invertebrados (de Celis and Barrio, 2009), hemos seleccionado cuatro secuencias para realizar un análisis

de 42 genes candidatos a ser regulados por Sal (C) y de 41 genes control (NC). Las secuencias seleccionadas fueron:

- Sitio de unión descrito para Spalt-related de *Drosophila melanogaster* (Barrio et al., 1996):  
TTATGAAAT
- Sitio de unión descrito para Sall1 de vertebrados (Yamashita et al., 2007):  
ATAA(A/T)(A/T)
- Sitios de unión descritos para Sall4 de vertebrados (Wu et al., 2006):  
AATTATTGCCCGGATTTCAT  
TTAACATTCTTTCCC

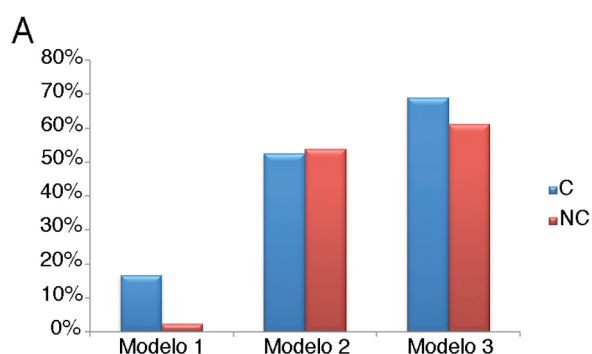
De acuerdo con estas secuencias, construimos tres modelos diferentes de predicción de unión. Cada modelo fue construido bien directamente usando la secuencia consenso o bien utilizando el porcentaje de cada nucleótido en la alineación de los sitios (matrices de posición de peso, ver materiales y métodos):

- Modelo 1: Se utilizó para la construcción de este modelo la secuencia de unión descrita para Salr de *Drosophila*.
- Modelo 2: Se utilizó la matriz de posición de peso detallada en (Yamashita et al., 2007) para el sitio de unión descrito para Sall1 en vertebrados.
- Modelo 3: Se utilizaron las cuatro secuencias de unión seleccionadas para este estudio. Para ello se realizó un alineamiento de las secuencias usando el programa informático ClustalW.

Basándonos en estos modelos se realizó la búsqueda de los posibles sitios de unión de Sal en ambas hebras de los 1000 pares de bases precedentes al sitio de inicio de la transcripción (TSS) de los 42 genes candidatos (C) y de 41 genes control (NC). Para ello se utilizó el programa informático MatScan (Blanco et al., 2006). Posteriormente, filtramos las predicciones obtenidas mediante el programa informático UCSC Genome Browser, analizando la conservación de los sitios identificados en 12 especies de *Drosophila*, descartando todos los sitios que no estuvieran conservados en 5 o más especies, incluyendo al menos *Drosophila pseudoobscura*. De acuerdo con estas reglas, encontramos los siguientes sitios conservados evolutivamente para cada uno de los modelos utilizados en los grupos de genes C y NC:

C	Sitios no conservados	Sitios conservados	% de sitios conservados	Genes con sitios conservados	% de genes conservados
Modelo 1	42	7	16,7	7	16,7
Modelo 2	430	72	16,7	22	52,4
Modelo 3	359	83	23,1	29	69,0
NC	Sitios no conservados	Sitios conservados	% de sitios conservados	Genes con sitios conservados	% de genes conservados
Modelo 1	31	1	3,2	1	2,4
Modelo 2	476	74	15,6	22	53,7
Modelo 3	398	71	17,8	25	61,1

Si comparamos el porcentaje de sitios conservados para los genes C frente a los NC sólo encontramos una diferencia notable utilizando el modelo 1 (Figura 44). En el análisis con los otros dos modelos el porcentaje de sitios es similar en ambos casos, indicando que su posible valor predictivo es muy bajo (Figura 44). El número encontrado de sitios de unión con el modelo 1, sin embargo, es muy reducido, quizás debido a que únicamente se analizan los 1000 pares de bases precedentes al sitio de inicio de la transcripción.



**Figura 44. Porcentaje de sitios de unión al ADN de las proteínas Sal identificados con distintos modelos de predicción.** Las barras azules muestran el porcentaje de sitios de unión al ADN de las proteínas Sal de los genes que variaron su expresión en fondo mutante para los genes *sal* (C) y las barras rojas indican lo mismo para genes que no variaron su expresión en fondo mutante para los genes *sal* (NC), para cada uno de los modelos de predicción.

#### 4.4. Análisis de la falta de función mediante ARN interferente de los genes identificados en los microarrays

Como aproximación alternativa a la identificación de candidatos a participar en las funciones de Sal, analizamos los fenotipos de falta de función de una fracción de los genes seleccionados mediante microarray. Para ello utilizamos la expresión, mediante el sistema Gal4/UAS, de ARNs interferentes dirigidos a cada gen. El fenotipo de un ala adulta tras eliminar *sal* y

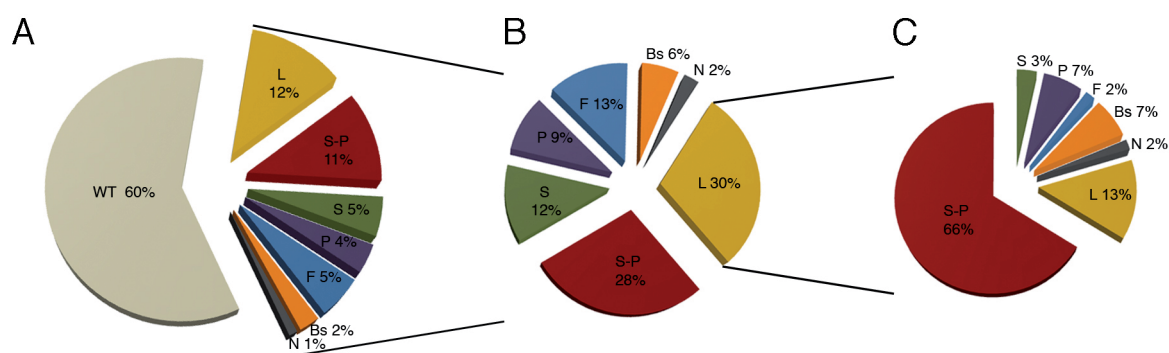


*salr* mediante esta técnica consiste en la falta de la vena L2, fusión L4-L5 y reducción del tamaño (Figura 10D). El fenotipo de expresar Sal por toda el ala consiste en la falta de las venas L2 y L5 y una reducción del tamaño (Figura 35C). Nuestra hipótesis es que la reducción en la expresión de genes que estén de alguna manera relacionados funcionalmente con Sal resultará en fenotipos similares a éstos. Se analizaron los fenotipos de falta de función de 491 genes de los 667 genes seleccionados del análisis del microarray. Para ello se utilizaron las líneas *sal<sup>EPV</sup>-Gal4*, *nub-Gal4* y *638-Gal4* (Figura 8), lo que nos permitió observar el efecto causado por la reducción de la expresión de los genes seleccionados en la región central del ala mediante la utilización de la línea *sal<sup>EPV</sup>-Gal4*, o en toda el ala mediante la utilización de las líneas *nub-Gal4* y *638-Gal4*. Cuando las líneas Gal4 utilizadas fueron *sal<sup>EPV</sup>-Gal4* y *nub-Gal4*, estos experimentos se realizaron en un fondo genético de sobre-expresión del gen *dicer*, cuya presencia aumenta la eficacia de la interferencia por el ARN-i.

Los fenotipos observados se clasificaron en las siguientes categorías:

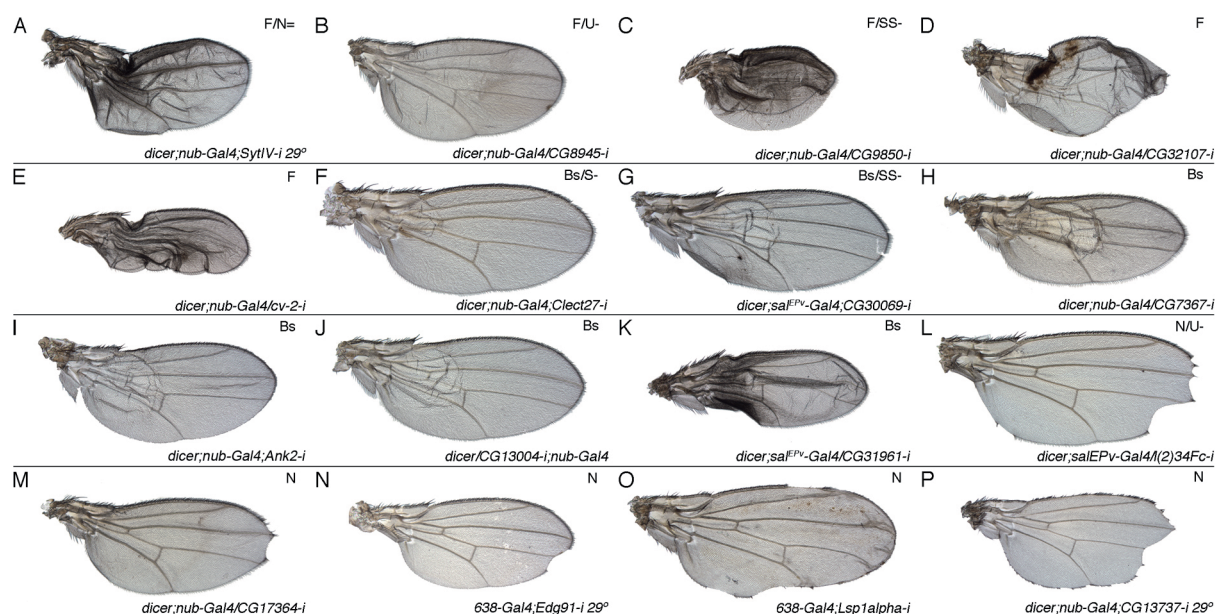
- WT: No se observa ninguna alteración en la formación del ala.
- S-P: El fenotipo observado presenta alteraciones en el tamaño y el patrón del ala.
- Bs: La reducción de la expresión del gen a estudio presenta problemas de adhesión de los epitelios dorsal y ventral, observándose burbujas en el ala.
- N: Observamos un fenotipo característico de la falta de la ruta de señalización Notch, es decir, falta del margen del ala.
- F: En esta categoría se engloban los fenotipos que presentan pliegues y arrugas en el ala.
- P: Alteraciones en el patrón de diferenciación de las venas del ala.
- S: Reducción del tamaño del ala respecto al de un ala silvestre.
- L: El conjunto de genes que comprende esta categoría no permiten que la mosca llegue a término, dado que la reducción de su expresión causa letalidad.

La anotación fenotípica de cada uno de los genes se muestra en la Tabla 3. De los 491 genes analizados el 60% están dentro de la categoría WT (Figura 45A). El 40% restante está englobado en el resto de categorías, siendo las más representativas las categorías S-P (11%) y L (12%), todas las demás aparecen con un porcentaje similar. En la Figura 45B se muestra el porcentaje de cada una de las categorías sin tener en cuenta los genes que están dentro de la categoría WT. Los genes que se encuentran dentro de la categoría L, que indica un fenotipo de letalidad, no siempre presentan este fenotipo con todas las líneas *Gal4* utilizadas. Cuando consideramos sólo las combinaciones viables observamos que la categoría más representativa es S-P (66%) (Figura 45C).

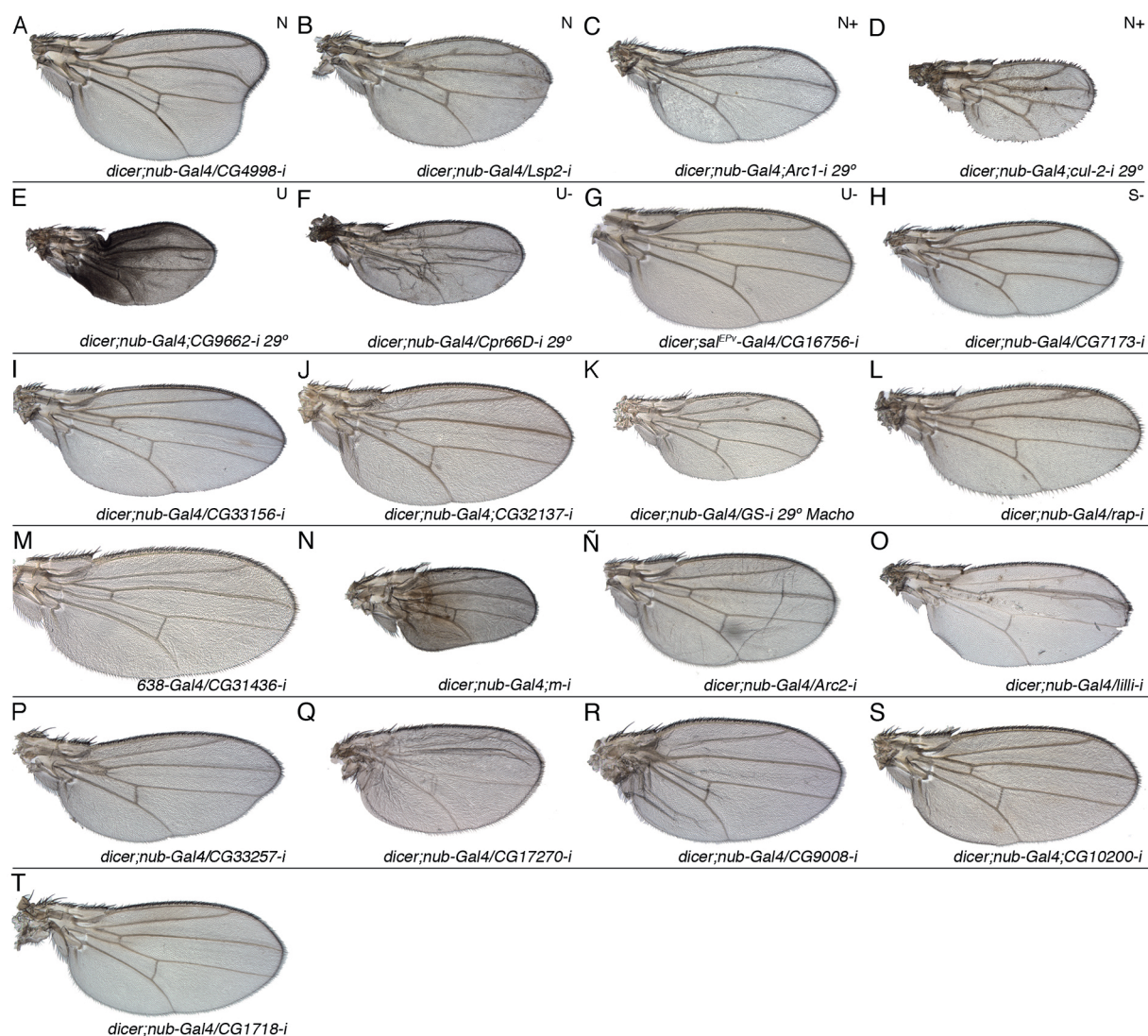


**Figura 45. Porcentajes de las clases fenotípicas encontradas mediante ARN interferentes de los genes identificados en los microarrays.** (A) Porcentaje de las clases fenotípicas encontradas incluyendo los fenotipos silvestres (WT). (B) Porcentaje de las clases fenotípicas encontradas excluyendo los fenotipos silvestres. (C) Porcentaje de las clases fenotípicas encontradas de los genes que muestran un fenotipo letal (L) utilizando una línea Gal4 y otro fenotipo utilizando otra línea. Las clases fenotípicas son: silvestre (WT), letal (L), tamaño-patrón (S-P), tamaño (S), patrón (P), arrugada (F), adhesión dorsal-ventral (Bs) y defectos en el margen del ala (N).

Ejemplos de las clases fenotípicas identificadas que no están relacionadas con el fenotipo de alas mutantes para los genes *sal/salr* (Bs, N y F) se muestran en la Figura 46. En las Figuras 47(S), 48(P) y 49-50(S-P) se presentan las alas correspondientes a los fenotipos S, P y S-P, las clases de fenotipos que podrían estar relacionadas con las funciones descritas para las proteínas Sal.

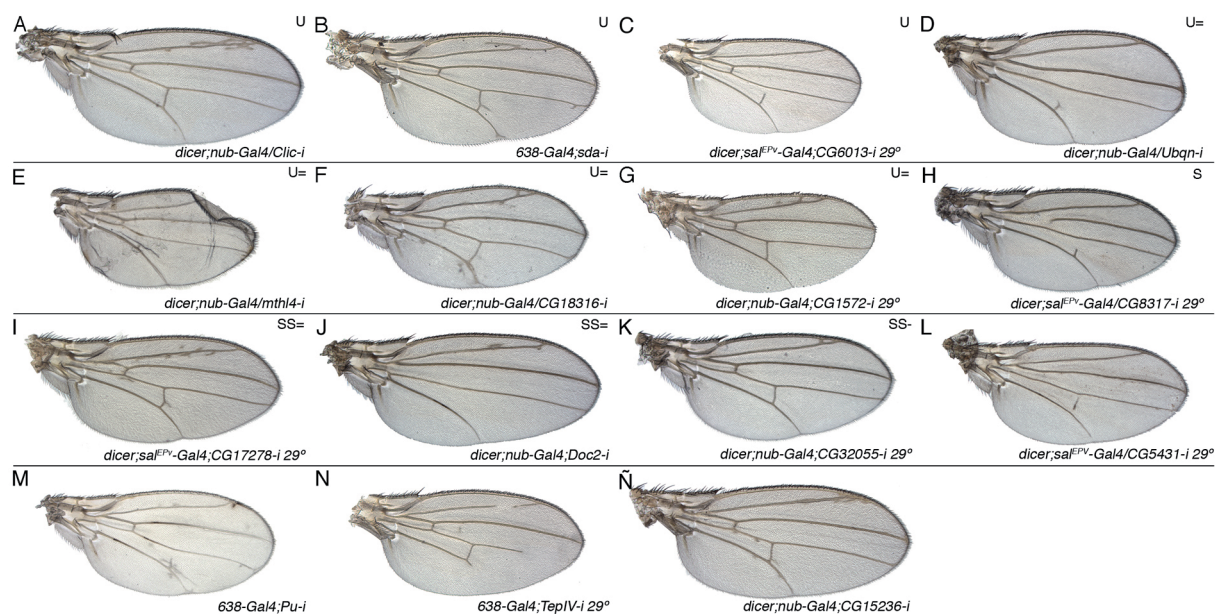


**Figura 46. Fenotipos no relacionados con la falta o ganancia de función de los genes *sal*.** (A-P) Fenotipos generados tras la expresión de ARN interferentes de genes identificados en los microarrays en la región de ala del disco imaginal de ala. Abajo y a la derecha se indica el ARN interferente de cada gen y la línea Gal4 utilizada. Si no se indica lo contrario, la temperatura a la que se sobre-expresaron los ARN interferentes fue a 25°C. Arriba y a la derecha se indica la categoría fenotípica dónde se incluye cada ARN interferente (F, arrugada, Bs, adhesión dorsal-ventra y N, defectos en el margen del ala) y la categoría de patrón de expresión del gen a estudio si se conoce (N=, U-, SS-, S-).



**Figura 47. Fenotipos de tamaño (S).** (A-T) Alas que muestran el fenotipo generado mediante la expresión de ARN interferentes de distintos genes. Abajo y a la derecha se indica el ARN interferente de cada gen así como la línea Gal4 utilizada. Si no se indica lo contrario, la temperatura a la que se sobre-expresaron los ARN interferentes fue a 25°C. Arriba y a la derecha se indica la categoría de patrón de expresión en la que se incluye cada gen analizado si se conoce (N, N+, U, U-, S-).



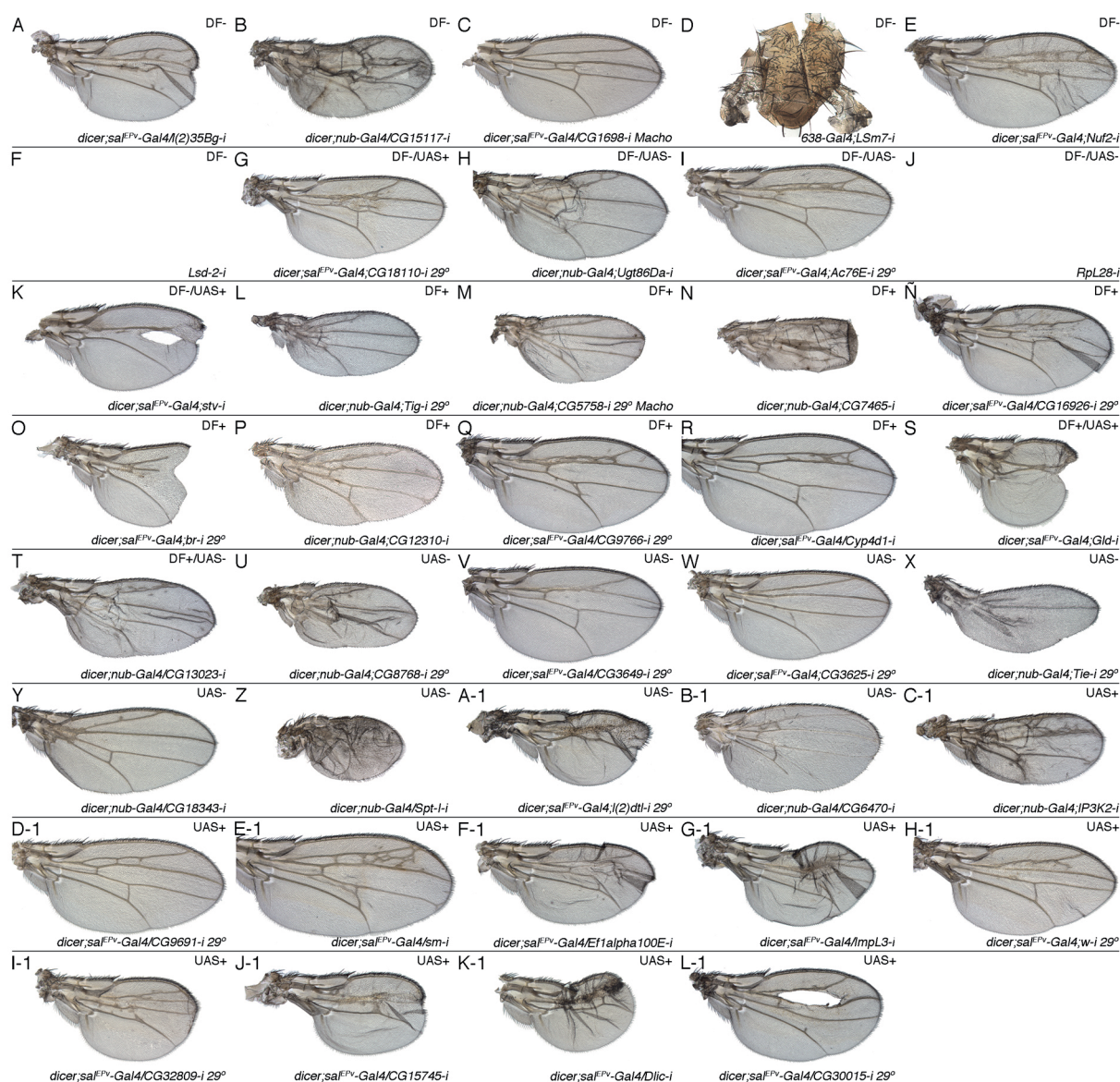


**Figura 48. Fenotipos de venas (P).** (A-Ñ) Alas que muestran el fenotipo generado mediante la expresión de ARN interferentes de distintos genes. Abajo y a la derecha se indica el ARN interferente de cada gen así como la línea Gal4 utilizada. Si no se indica lo contrario, la temperatura a la que se sobre-expresaron los ARN interferentes fue a 25°C. Arriba y a la derecha se indica la categoría de patrón de expresión en la que se incluye cada gen analizado si se conoce (U, U=, S, SS=, SS-).



**Figura 49. Fenotipos de tamaño y patrón de venas (S-P).** (A-Z-1) Alas que muestran el fenotipo generado mediante la expresión de ARN interferentes de distintos genes. Abajo y a la derecha se indica el ARN interferente de cada gen así como la línea Gal4 utilizada. Si no se indica lo contrario, la temperatura a la que se sobre-expresaron los ARN interferentes fue a 25°C. Arriba y a la derecha se indica la categoría de patrón de expresión en la que se incluye cada gen analizado (S-, S+, SS-, SS+, S=, SS=, S, N+, U-, U+, N=, U=, N, U).





**Figura 50. Fenotipos de tamaño y patrón de venas (S-P).** (A-L-1) Alas que muestran el fenotipo generado mediante la expresión de ARN interferentes de distintos genes. Abajo y a la derecha se indica el ARN interferente de cada gen así como la línea Gal4 utilizada. Si no se indica lo contrario, la temperatura a la que se sobre-expresaron los ARN interferentes fue a 25°C. Arriba y a la derecha se indica el/los microarrays dónde se identificaron los genes analizados (DF-, DF+, UAS-, UAS+).

TABLA 3

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
<i>Ac3</i>	<i>CG1506</i>	DF-	M		BL-28626	WT
<i>Ac76E</i>	<i>CG7978</i>	DF-//UAS-	M		7978R-3	S-P
<i>Adh</i>	<i>CG32954/CG3481</i>	DF+	RedOx		3484R-2	WT
<i>Ady43A</i>	<i>CG1851</i>	DF-	M		33133	WT
<i>agt</i>	<i>CG1303</i>	DF+//UAS-	DNA	U+	104331	WT
<i>Aldh</i>	<i>CG3752</i>	UAS+	M		3752R-1	WT
<i>Ama</i>	<i>CG2198</i>	UAS-	CA	S=	BL-33416	L/S-P
<i>amd</i>	<i>CG10501</i>	DF+	M		105871	WT
<i>ana</i>	<i>CG8084</i>	UAS-	Sig	SS-	BL-27515	S-P
<i>Ance</i>	<i>CG8827</i>	DF+	P		8827R-1	Bs
<i>Ank2</i>	<i>CG42734</i>	UAS+	Cy		7462R-2	Bs
<i>AnnIX</i>	<i>CG5730</i>	UAS+	Cy		106867	WT
<i>Arc1</i>	<i>CG12505</i>	DF-//UAS-	DNA	N+	48130	S
<i>Arc2</i>	<i>CG13941</i>	DF-//UAS-	CGh		3464	S/F
<i>b6</i>	<i>CG3100</i>	UAS+	Sig	U-	14526	S-P
<i>bbc</i>	<i>CG6016</i>	DF+	M		7989	WT
<i>betaTub97EF</i>	<i>CG4869</i>	DF+	Sig	S-	4869R-2	L/S-P
<i>Blimp-1</i>	<i>CG5249</i>	UAS+	DNA	U-	5249R-2	S-P/F
<i>BM-40-SPARC</i>	<i>G6378</i>	UAS-	CA		100566	WT
<i>br</i>	<i>CG11491</i>	DF+	DNA		BL-27272	L/S-P
<i>Brd</i>	<i>CG3096</i>	UAS-	Sig	S=	107929	L/S-P
<i>Cad86C</i>	<i>CG42601/CG4655</i>	UAS+	CA	S-	BL-27045	WT
<i>cer</i>	<i>CG10460</i>	UAS-	P	S	22752	WT
<i>cerv</i>	<i>CG15645</i>	UAS-	CG		103221	WT
<i>CG10041</i>	<i>CG10041</i>	UAS+	P	U-	110063	WT
<i>CG10176</i>	<i>CG10176</i>	UAS+	CG	U	43454	WT
<i>CG10200</i>	<i>CG10200</i>	DF+	CG		BL-28759	S
<i>CG10311</i>	<i>CG10311</i>	UAS-	CG		10311R-7	WT
<i>CG10559</i>	<i>CG10559</i>	DF+	CGh		10559R-1	WT
<i>CG10681</i>	<i>CG10681</i>	UAS+	CGh		10681R-2	WT
<i>CG10863</i>	<i>CG10863</i>	UAS-	RedOx		103433	F

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
CG10962	CG7090	DF-	RedOx	U	7090R-2	WT
CG11007	CG11007	UAS-	RedOx		40833	F/S
CG11034	CG11034	DF+	P	U-	37941	S-P
CG11261	CG11261	UAS-	P		105927	WT
CG11357	CG11357	DF-	P	U-	108467	L/Bs
CG11370	CG11370	DF+	CG	S-	2710	S
CG11550	CG11550	UAS+	CGh		11550R-2	WT
CG11883	CG11883	UAS-	DNA	U-	38590	S-P
CG11897	CG11897	DF-//UAS-	Tr		11897R-2	WT
CG11905	CG11905	UAS+	Cy		109041	F
CG12116	CG12116	DF+	RedOx		6498	WT
CG12129	CG12129	DF-	RNA	U=	12129R-1	S-P
CG12182	CG12182	DF+	CGh	U	12182R-1	L/S-P
CG12256	CG12256	UAS+	P	U-	12256R-2	WT
CG12310	CG12310	DF+	CG		14185	L/S-P
CG12481	CG12481	UAS-	CG		31945	WT
CG12519	CG12519	DF+	CG		109054	WT
CG12699	BEST:GH14656	DF-	CG		108484	WT
CG1273	CG1273	UAS+	CG	S-	1273R-3	WT
CG12868	CG12868	UAS-	CG		12868R-4	WT
CG12926	CG12926	DF+	Tr	U	109580	N
CG13004	CG13004	DF-	CG		45186	Bs
CG13023	CG13023	DF+//UAS-	CG		16460	L/S-P
CG13053	CG13053	UAS+	CG		9227	WT
CG13062	CG13062	UAS+	CG		48760	WT
CG13063	CG13063	UAS+	CG		102782	F
CG13064	CG13064	UAS+	CG		47876	WT
CG13258	CG13258	DF+//UAS+	CG		13258R-1	WT
CG1344	BcDNA:LD22679	DF-	P		108838	WT
CG13618	CG13618	UAS+	CGh	U-	14714	WT
CG13737	CG13737	UAS+	CG		52582	N

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
CG13829	CG13829	DF-	CGh		13829R-2	L
CG13850	CG13850	UAS+	P	U-	100863	F
CG14082	CG14082	UAS+	CG		40899	WT
CG14120	CG14120	DF-	DNA		47583	WT
CG14326	CG14326	UAS+	CG		8032	WT
CG14332	CG14332	DF+	CG		41164	WT
CG14341	CG14341	DF-	CG	U	107525	WT
CG14470	CG14470	UAS+	P	S=	14470R-1	WT
CG14567	CG14567	UAS+	CG		41248	L
CG14590	CG14590	UAS+	DNA	U-	41536	WT
CG14598	CG14598	UAS+	CG	S=	14598R-3	L/S-P
CG14636	CG14636	UAS-	CG	U=	14636R-3	WT
CG14695	CG14695	DF+//UAS-	CGh		14695R-1	WT
CG14869	CG6107	DF+	P	U-	110157	WT
CG14935	CG14935	UAS-	M		102201	WT
CG15046	CG15046	UAS+	P		15046R-1	WT
CG15080	CG15080	DF+	CG		106073	F
CG15117	CG15117	DF-	P		108570	S-P
CG15173	CG15173	UAS-	CGh		15173R-1	WT
CG15212	CG15212	DF-//UAS-	CG	S-	44952	S-P
CG15236	CG15236	DF-	CG		15236R-1	P
CG15282	CG15282	UAS-	CG	U=	7712	S
CG15369	CG15369	DF+	P	U-	106111	WT
CG15404	CG15404	DF+	CG		23313	L
CG15544	CG15544	UAS+	CG		39997	WT
CG15571	CG15571	DF-//UAS-	CG		107732	WT
CG15628	CG15628	UAS+	M		15628R-4	WT
CG1572	CG1572	UAS+	CGh	U=	23220	P
CG15739	CG15739	DF-	P	U-	106016	F
CG15745	CG15745	UAS+	CG		15745R-2	L/S-P
CG15765	CG15765	UAS-	CGh		BL-29421	WT

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
CG15784	CG15784	DF-//UAS-	CG	S+	15784R-3	L/S-P
CG15890	CG15890	UAS-	Tr		BL-28768	WT
CG15896	CG15896	UAS-	CG		106643	F
CG1600	CG1600	UAS+	RedOx	U	108325	WT
CG16700	CG16700	UAS+	Tr		45188	WT
CG16704	CG16704	DF+	P	N	12995	WT
CG16712	CG16712	DF+	P	U-	109238	WT
CG16713	CG16713	DF+	P	N=	105067	WT
CG16733	CG16733	UAS+	M		16733R-1	WT
CG16756	CG16756	DF-	P	U-	102908	S
CG16884	BG:DS00180.3	UAS-	CG	SS-	51362	S-P
CG16885	CG16885	UAS-	CG	SS-	16885R-1	L/S-P
CG16926	CG16926	DF+	CG		39882	L/S-P
CG16947	CG16947	DF-//UAS-	CGh	U-	108103	WT
CG1698	CG1698	DF-	Tr		101947	S-P
CG17018	CG17018	UAS+	RNA	N=	17018R-1	WT
CG17036	CG17036	DF+	Tr		17036R-1	WT
CG17104	CG17104	UAS-	CG		17104R-3	WT
CG1718	CG1718	UAS-	Tr		1718R-3	S
CG17244	CG17244	DF+	CG		6838	WT
CG17270	CG17270	DF+	CGh		106420	S/F
CG17278	CG17278	UAS-	Sig	SS=	44347	P
CG17352	CG17352	DF+	CGh	N=	100646	S-P
CG17364	CG17364	DF-	Cy		101844	N
CG17684	CG17684	UAS-	P	U=	103199	WT
CG17698	CG17698	UAS-	P		35632	WT
CG17726	CG17726	UAS+	CG		32991	WT
CG17838	CG17838	DF+	RNA		17838R-3	WT
CG17843	CG17843	UAS+	RedOx		BL-28023	WT
CG18110	CG18110	DF-//UAS+	Tr		BL-25810	S-P
CG18213	CG18213	DF-//UAS-	CGh	N+	18213R-2	WT



TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
CG18278	CG18278	DF+	M		BL-28520	WT
CG18316	CG18316	DF-	CG	U=	18316R-1	L/P
CG18343	CG18343	UAS-	CG		101122	S-P
CG1835	CG1835	UAS+	CG		102124	WT
CG18522	CG18522	DF-//UAS-	RedOx	N+	100330	WT
CG18547	CG18547	UAS-	RedOx		100490	WT
CG18563	CG18563	UAS-	P	N=	104264	WT
CG18600	CG18600	UAS-	DNA		18600R-1	WT
CG18812	CG18812	DF+	M		39224	WT
CG18853	CG18853	UAS+	DNA		50099	WT
CG2145	CG2145	UAS-	P	U-	14874	L/S-P
CG2150	CG2150	UAS+	CGh		44038	WT
CG2177	CG2177	DF+//UAS+	Tr	N=	51083	WT
CG2201	CG2201	DF+	P		108958	WT
CG2233	CG2233	DF+	CG	U	2233R-3	WT
CG2617	CG2617	UAS+	CGh		2617R-3	WT
CG2909	CG2909	DF-	CG	U	100165	P
CG30015	CG30015	UAS+	CG		33662	L/S-P
CG30017	CG30017	DF-	CG		44785	WT
CG30069	CG13017	DF-	CG	SS-	25562	L/Bs
CG3008	CG3008	UAS-	P	U+	43732	L/S-P
CG30089	CG30089	UAS+	CGh		BL-28321	WT
CG30101	CG30101	UAS+	CG	S-	15514	WT
CG30152	CG30152	UAS+	CG		38848	WT
CG30196	CG30196	DF-//UAS-	Sig	N+	30196R-3	WT
CG30217	CG30217	DF-//UAS-	Sig	S-	25604	WT
CG30428	CG30428	DF+//UAS+	CG	U	24774	WT
CG31098	CG10634	DF-//UAS-	P	U-	31098R-2	P
CG31176	CG6328	UAS+	CG		31176R-1	WT
CG31436	CG31436	DF+	CGh		21344	S
CG31559	CG31559	DF+//UAS+	RedOx		31559R-1	WT

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
CG31607	CG31607	UAS-	CG		31607R-1	WT
CG31612	CG11631	DF-	CGh	N=	30545	WT
CG31672	CG4248	DF-	CG	U-	21388	WT
CG31698	CG31698	DF+	CG	U	13022	WT
CG31961	CG31961	UAS-	CGh		31961R-3	L/Bs/S
CG31997	CG31997	UAS-	CG		31997R-2	WT
CG32055	CG32055	DF-//UAS-	Sig	SS-	6335	P
CG32107	CG32107	DF-//UAS-	CG		102854	F
CG32137	CG32137	UAS+	CGh		32137R-2	S
CG32198	CG32198	DF+	CG		41327	Bs
CG32364	CG32364	UAS-	DNA	U-	26045	WT
CG32368	CG32368	UAS-	CG		103313	WT
CG32372	CG7545	DF-//UAS-	CGh	SS=	32372R-2	L
CG32373	CG32373	UAS-	Sig	SS=	32373R-1	WT
CG32412	CG10487	DF-//UAS+	P	U	38277	S-P
CG32495	CG32495	UAS-	RedOx		49720	WT
CG32625	CG32625	UAS-	CGh		103216	WT
CG32809	EG:171E4.3	UAS+	Cy		3783R-2	L/S-P
CG32850	CG32850	DF+//UAS+	CGh	S-	BL-31554	WT
CG33156	CG6152/ CG30063	DF+	M		6152R-3	S
CG33205	CG8154	DF-	P	S-	32049R-1	L/S-P
CG33257	CG33257	UAS+	CG		102077	S
CG33333	CG33333	DF+	CG		48457	WT
CG3339	CG3339	UAS-	Cy		41918	WT
CG33960	CG33960	UAS-	Sig	U-	BL-28932	WT
CG33970	CG31085/CG6162	UAS-	Tr	SS-	33090	WT
CG3436	CG3436	UAS+	RNA		103140	F
CG34406	CG3485	UAS-	DNA	U-	43767	WT
CG3568	CG3568	DF-//UAS-	CG		18447	WT
CG3625	CG3625	UAS-	CGh		3625R-1	S-P
CG3649	CG3649	UAS-	Tr		3649R-1	S-P

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
CG3726	CG3726	UAS-	DNA	S-	41090	WT
CG3837	CG3837	UAS+	Sig		3837R-1	WT
CG3857	CG3857	UAS-	CG	U=	44733	WT
CG3902	CG3902	UAS-	RedOx		3902R-1	WT
CG4073	CG4073	DF-	CG		44402	WT
CG4210	CG4210	UAS-	M		104004	WT
CG42254	CG12854	DF+	CG		38712	WT
CG42319	CG17041	DF-	P		102469	F
CG4267	CG4267	UAS+	M		BL-32332	WT
CG4398	CG4398	UAS-	Sig	U-	4398R-1	WT
CG4409	CG4409	DF-//DF+//UAS-	CG	N=	4409R-2	S-P
CG4511	CG4511	UAS+	M		4511R-1	WT
CG4565	CG4565	UAS+	DNA	U-	BL-32893	WT
CG4586	CG4586	DF+//UAS+	M		21886	WT
CG4928	CG4928	DF+	CGh	U	4928R-3	WT
CG4998	CG4998	UAS+	P	N	4998R-2	S
CG5022	CG5022	UAS+	Cy		BL-33359	WT
CG5171	CG5171	DF+	M		108686	WT
CG5217	CG5217	UAS+	CG		22031	WT
CG5391	CG5391	DF+	CG	N=	14452	WT
CG5431	CG5431	UAS-	M		5431R-4	P
CG5535	CG5535	DF-//UAS-	Tr	U	107030	F
CG5758	CG5758	DF+	CGh		5758R-2	S-P
CG5830	CG5830	DF+	M	U	BL-31746	WT
CG5835	CG5835	UAS+	CG		33358	WT
CG5958	CG5958	DF+	Tr	U	20979	F/P
CG6013	CG6013	DF+	DNA	U	6013R-2	L/P
CG6043	CG6043	UAS+	CGh		6043R-2	WT
CG6272	CG6272	DF-//UAS-	DNA	N+	101871	WT
CG6357	CG6357	DF+//UAS+	P	S-	8782	WT
CG6470	CG6470	UAS-	CGh		27633	S-P

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
CG6654	CG6654	UAS+	DNA	U-	105550	WT
CG6701	CG6701	DF+//UAS+	DNA	U-	6701R-1	WT
CG6983	CG6983	UAS-	CG		109917	WT
CG7080	CG7080	DF+//UAS-	CG	U-	104928	WT
CG7173	CG7173	UAS+	P	S-	7173R-1	S
CG7201	CG7201	UAS-	CG	SS-	101198	F
CG7367	CG7367	UAS+	M		43822	Bs
CG7420	CG7420	DF-	DNA	U-	BL-32510	L
CG7465	CG7465	DF+	CGh		38162	S-P
CG7470	CG7470	DF+	RedOx		101476	WT
CG7565	CG7565	UAS+	Cut		7565R-1	WT
CG7587	CG7587	DF+	CG		7587R-1	WT
CG7720	CG7720	DF+	Tr		7720R-1	WT
CG7787	CG7787	UAS-	Sig		BL-32843	WT
CG7900	CG7900	UAS+	M		7900R-1	WT
CG7906	CG7906	DF+	P	U-	BL-30519	WT
CG8172	CG8172	UAS+	P	S-	101724	WT
CG8317	CG8317	UAS-	CG	S	40704	P
CG8360	CG8360	UAS+	M		8360R-6	WT
CG8451	CG8451	DF+//UAS+	Tr		8451R-3	WT
CG8503	CG8503	DF+	DNA		24113	WT
CG8654	CG8654	UAS-	Tr		8654R-1	WT
CG8675	CG8675	DF-	CG	U-	8675R-1	S-P
CG8768	CG8768	UAS-	M		8768R-2	S-P
CG8945	CG8945	DF+	P	U-	46925	F
CG8965	CG8965	DF-	Sig	S-	8965R-3	WT
CG9008	CG9008	UAS-	M		107828	S
CG9027	CG13200	UAS-	RedOx		9027R-4	WT
CG9040	CG9040	DF+	CG		102483	WT
CG9238	CG9238	UAS+	P	N=	9238R-2	S-P
CG9662	CG9662	UAS-	M	U	7278	S/F

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
<i>CG9689</i>	<i>CG9689</i>	UAS+	CG		9689R-3	WT
<i>CG9691</i>	<i>CG9691</i>	UAS+	CG		13341	S-P
<i>CG9747</i>	<i>CG9747</i>	UAS+	RedOx	S=	9747R-1	L
<i>CG9766</i>	<i>CG9766</i>	DF+	CGh		9766R-2	S-P
<i>CG9812</i>	<i>CG9812</i>	UAS+	CG		102880	WT
<i>CG9850</i>	<i>CG11169</i>	DF+//UAS-	P	SS-	107199	F
<i>CG9945</i>	<i>CG9945</i>	DF-	Cy		105944	F
<i>Chrac-16</i>	<i>CG15736</i>	DF-	DNA		104787	WT
<i>Cht7</i>	<i>CG1869</i>	DF-	Cut	SS-	1869R-3	L/S-P
<i>Cirl</i>	<i>CG8639</i>	UAS+	Sig	U-	100749	S-P
<i>Clect27</i>	<i>CG3244</i>	DF+//UAS-	CGh	S-	3244R-1	L/Bs
<i>Clic</i>	<i>CG10997</i>	DF-//UAS+	M	U	10997R-1	P
<i>Cpr49Ah</i>	<i>CG8515</i>	UAS+	Cut	S=	8515R-1	L/S-P
<i>Cpr64Aa</i>	<i>CG15006</i>	UAS-	Cut		42880	WT
<i>Cpr66D</i>	<i>CG32029</i>	DF-//UAS+	Cut	U-	52276	S/F
<i>Cpr67Fa2</i>	<i>CG18349</i>	DF+	CG		52337	Bs
<i>Cpr72Ea</i>	<i>CG4818</i>	DF-//UAS+	Cut	U	4818R-3	WT
<i>Cpr78E</i>	<i>CG7160</i>	DF-	Cut		7160R-3	WT
<i>Cpr97Ea</i>	<i>CG6131</i>	UAS+	Cut		6131R-2	WT
<i>CR43361</i>	<i>CR43361</i>	DF-//UAS-	CG	N+	102286	S-P
<i>CRMP</i>	<i>CG1411</i>	DF+//UAS+	M		BL-31876	WT
<i>cul-2</i>	<i>CG1512</i>	UAS-	P	N+	1512R-3	S/N
<i>cv-2</i>	<i>CG15671</i>	UAS+	CG		109915	F
<i>Cyp18a1</i>	<i>CG6816</i>	UAS+	RedOx	U	104180	WT
<i>Cyp303a1</i>	<i>CG4163</i>	UAS+	RedOx		51495	WT
<i>Cyp4d1</i>	<i>CG3656</i>	DF+	RedOx		3656R-3	L/S-P
<i>Cyp4e2</i>	<i>CG2060</i>	UAS-	RedOx		49044	WT
<i>Cyp6g1</i>	<i>CG8453</i>	DF+	RedOx		8453R-1	WT
<i>daw</i>	<i>Alp23B/CG16987</i>	UAS+	Sig	S-	105309	S
<i>Ddc</i>	<i>CG10697</i>	UAS+	M		BL-27030	WT
<i>Dg</i>	<i>CG18250</i>	UAS+	Cy		107029	P

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
<i>Dip2</i>	CG9771	UAS-	DNA		9771R-3	WT
<i>DI</i>	CG3619	UAS-//UAS+	Sig	SS+	BL-28032	L/P
<i>dlg1</i>	CG1725	DF-	Sig	U-	BL-25780	L
<i>Dlic</i>	CG1938	UAS+	Cy		101340	L/S-P
<i>DnaJ-1</i>	CG10578	UAS+	Cy		BL-32899	WT
<i>Doc1</i>	CG5133	UAS-	DNA	SS=	16747	WT
<i>Doc2</i>	CG5187	UAS-	DNA	SS=	5187R-1	P
<i>dpr19</i>	CG13140	DF-	CGh	N=	13140R-1	WT
<i>drm</i>	CG10016	UAS+	CGh		102405	WT
<i>dve</i>	CG5799	UAS-	DNA	SS=	109538	S-P
<i>dy</i>	CG9355	UAS+	Cut	U-	9355R-1	L/S-P
<i>e</i>	CG3331	UAS+	M		BL-28612	WT
<i>E23</i>	CG3327	DF+//UAS+	Tr		BL-26252	WT
<i>Ect3</i>	CG3132	UAS-	M		16779	WT
<i>Ect4</i>	CG34373/CG13680	UAS-	Sig	U-	22612	WT
<i>Edg91</i>	CG7539	UAS+	Cut		7539R-1	N
<i>Ef1alpha100E</i>	CG1873	UAS+	RNA		102736	L/S-P
<i>EG:103E12.2</i>	CG14629	DF+	CG		14629R-2	WT
<i>Eip55E</i>	CG5345	UAS-	M		5345R-2	WT
<i>emc</i>	CG1007	UAS+	DNA		BL-26738	WT
<i>Epac</i>	CG34392	UAS+	M		110077	F
<i>escl</i>	CG5202	UAS-	DNA	U+	49982	WT
<i>esn</i>	CG12833	UAS+	CGh	S-	12833R-3	WT
<i>Ets21C</i>	CG2914	UAS+	DNA	S-	106153	WT
<i>fbp</i>	CG31692	UAS-	M		10611R-1	WT
<i>Fbp1</i>	CG17285	DF+	Tr	U	17285R-6	WT
<i>Fbp2</i>	CG3763	DF+	RedOx	U	33172	S-P
<i>fru</i>	CG14307	UAS-	DNA	U-	105005	F
<i>fs(1)Yb</i>	CG2706	DF+//UAS-	DNA	U-	110056	WT
<i>GABA-B-R1</i>	CG15274	DF-	Sig		BL-28353	WT
<i>Gbeta5</i>	CG10763	DF+	CGh		BL-28310	WT

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
<i>gkt</i>	CG8825	DF+//UAS-	CGh	U=	109757	S-P
<i>Gld</i>	CG1152	DF+//UAS+	RedOx		38041	L/S-P
<i>GS</i>	CG6835	UAS-	M		49801	S
<i>GstE1</i>	CG5164	DF-//UAS-	RedOx	U	40581	WT
<i>GstE6</i>	CG17530	DF-//DF+//UAS-	RedOx		50090	WT
<i>H2.0</i>	CG11607	UAS-	DNA	U-	15876	L/S-P
<i>His1:CG31617</i>	CG31617	DF+//UAS+	DNA	S=	110118	L/S-P
<i>Hn</i>	CG7399	DF+	RedOx		BL-29540	WT
<i>Hsp26</i>	CG4183	DF+	P		6983	WT
<i>Hsp67Bc</i>	CG4190	UAS+	P		4190R-2	WT
<i>Idgf4</i>	CG1780	DF+//UAS+	Sig	U-	1780R-4	WT
<i>ImpE1</i>	CG32356	DF+//UAS-	CGh	S=	32356R-3	L/S-P
<i>ImpL2</i>	CG15009	UAS+	CA	S+	15009R-3	WT
<i>ImpL3</i>	CG10160	UAS+	M		10160R-1	S-P
<i>Indy</i>	CG3979	UAS-	Tr		9981	WT
<i>insc</i>	CG11312	UAS+	RNA		11312R-1	WT
<i>IP3K1</i>	CG4026	UAS+	M		BL-31733	WT
<i>IP3K2</i>	CG34359	UAS+	M		1630R-1	S-P
<i>Irbp</i>	CG5247	UAS-	DNA	U+	5247R-2	S-P
<i>jbug</i>	CG30092/CG11605	UAS+	Cy		BL-31590	Bs
<i>kay</i>	CG33956	UAS+	DNA		BL-33379	WT
<i>l(2)03659</i>	CG8799	DF+//UAS-	Tr	U-	100105	WT
<i>l(2)34Fc</i>	CG7532	UAS-	P	U-	12405	N
<i>l(2)35Bg</i>	CG4180	DF-//DF+	CGh		4180R-1	S-P
<i>l(2)dtl</i>	CG11295	UAS-	CGh		11295R-1	S-P
<i>l(2)efl</i>	CG4533	DF-	CG		40531	WT
<i>l(3)87Df</i>	CG7620	DF+	CGh		30391	WT
<i>l(3)mbn</i>	CG12755	UAS-	Cut		BL-32962	WT
<i>l(3)S147910/ver</i>	CG14121	DF-//DF+//UAS-	DNA	U+	110243	WT
<i>lama</i>	CG10645	UAS+	CG		10645R-1	WT
<i>lilli</i>	CG8817	DF-	DNA		8817R-1	L/S/F



TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
<i>lola</i>	CG12052	UAS+	DNA	U-	BL-26714	L/F
<i>Lsd-2</i>	CG9057	DF-	M		102269	L/S-P
<i>LSm7</i>	CG13277	DF-	RNA		23862	L/S-P
<i>Lsp1alpha</i>	CG2559	DF+	Tr		52353	L/N
<i>Lsp1beta</i>	CG4178	DF+	Tr		4178R-3	WT
<i>Lsp1gamma</i>	CG6821	DF+	Tr		38129	WT
<i>Lsp2</i>	CG6806	DF+	Tr	N	109979	S
<i>m</i>	CG9369	DF-//UAS+	Cut		8036	S
<i>m4</i>	CG6099	UAS-	Sig	S-	BL-29378	WT
<i>mbi</i>	CG33197	DF+//UAS-	DNA	U-	29585	Bs/P
<i>Men</i>	CG10120	UAS-	RedOx		10120R-3	WT
<i>Mhc</i>	CG17927	UAS-	Cy		BL-26299	WT
<i>miple</i>	CG1221	DF-//UAS-	Sig	U-	1221R-1	WT
<i>mod(mdg4)</i>	CG32491	DF-	DNA	U-	BL-32995	F
<i>moody</i>	CG4322	UAS+	Sig	U-	4322R-1	S-P
<i>Msh6</i>	CG7003	DF-//UAS-	DNA	S=	7003R-2	L/S-P
<i>mthl4</i>	CG6536	DF+	Sig	U=	50752	P
<i>mthl8</i>	CG32475	DF-	Sig	U-	4071	WT
<i>mus205</i>	CG1925	DF+	DNA	U+	103755	S-P
<i>nab</i>	CG15000	UAS-	DNA	SS=	15000R-1	WT
<i>nemy</i>	CG8776	DF+//UAS-// UAS+	RedOx		40803	WT
<i>Nep1</i>	CG5905	UAS-	P	S=	5894R-1	WT
<i>net</i>	CG11450	DF-//UAS-	DNA		BL-26204	P
<i>NetA</i>	CG18657	UAS+	CGh	SS-	18657R-2	WT
<i>nimB2</i>	CG31839	DF+	Sig	U-	105925	WT
<i>nod</i>	CG1763	UAS+	DNA	U-	48150	WT
<i>Nos</i>	CG6713	DF-	DNA	U-	BL-28792	WT
<i>Nox</i>	CG34399/CG3896	UAS+	RedOx		3896R-2	WT
<i>Npc2b</i>	CG3153	UAS+	CA	S=	3153R-3	WT
<i>NT1</i>	CG42576/CG32242	UAS+	CD	S-	32242R-1	WT
<i>ntc</i>	CG10855	DF+	P		107547	WT

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
<i>nub</i>	CG34395	UAS-	DNA		BL-28338	WT
<i>nuf</i>	CG33991	UAS+	Cy		7867R-2	WT
<i>Nuf2</i>	CG8902	DF-	Cy		23650	L/S-P
<i>Obp56a</i>	CG11797	UAS-	Sig	U-	100850	WT
<i>Obp99b</i>	CG7592	DF+	Sig	N	6286	L/S-P
<i>Obp99c</i>	CG7584	DF+	Sig		7584R-3	WT
<i>odd</i>	CG3851	UAS+	DNA	S	9647	L/S-P
<i>opa</i>	CG1133	UAS-	DNA	S-	1133R-3	L/S-P/N
<i>Optix</i>	CG18455	DF+//UAS-	DNA	SS+	18455R-2	S-P
<i>Orct</i>	CG6331	DF+	Tr	U	52658	WT
<i>os</i>	CG5993	UAS+	Cy		5993R-1	WT
<i>Oseg5</i>	CG9333	DF+	Cy	U-	100020	S-P
<i>Osi14</i>	CG1155/Sp558	DF-//UAS-	CG	S=	102979	WT
<i>path</i>	CG3424	UAS-	Tr		44536	WT
<i>pdm2</i>	CG12287	UAS-	DNA	U-	BL-29543	Bs
<i>PebIII</i>	CG11390	UAS-	CGh		5622	WT
<i>PFE</i>	CG15151/rdo	UAS-	CGh		107213	F
<i>PGRP-LC</i>	CG4432	DF+	DNA	U-	4432R-1	WT
<i>Phk-3</i>	CG9358	UAS+	Sig	S=	9358R-2	WT
<i>phr</i>	CG11205	DF+//UAS+	DNA	U-	35497	WT
<i>phr6-4</i>	CG2488	DF-	DNA	U-	2488R-3	WT
<i>pinta</i>	CG13848	DF+//UAS+	M	U-	13848R-4	WT
<i>pio</i>	CG3541	DF+	Cut	S	3541R-1	L/S-P
<i>Pka-C1</i>	CG4379	UAS+	Sig	U-	101524	S-P
<i>pnt</i>	CG17077	DF+//UAS+	DNA	U-	BL-31936	WT
<i>Poxn</i>	CG8246	UAS-	DNA		BL-26238	WT
<i>ppk20</i>	CG7577	DF-//UAS-// UAS+	Tr	U-	36659	S
<i>Prx2540-2</i>	CG11765	DF-//UAS-	RedOx		109152	F
<i>Prx5</i>	CG32920/CG7217	DF-	RedOx		7215R-1	WT
<i>pst</i>	CG8588	UAS+	M	U=	8588R-1	WT
<i>Ptpa</i>	CG3289	DF+	Sig	U-	41913	WT

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
<i>Ptr</i>	CG11212	UAS+	Sig	U-	11212R-2	WT
<i>Pu</i>	CG9441	UAS+	Cut		9441R-1	P
<i>qua</i>	CG6433	UAS+	Cy		27623	WT
<i>r2d2</i>	CG7138	DF-	RNA		7138R-2	WT
<i>Rad1</i>	CG3240	DF-	DNA	U-	12676	WT
<i>Rala</i>	CG2849	UAS-	Sig	S	43622	S-P
<i>RanBP3</i>	CG10225	DF+	Sig	U-	104432	F
<i>rap</i>	CG3000	UAS+	Cy		25550	S
<i>Rcd6</i>	CG11175	UAS+	CG		37199	WT
<i>rec</i>	CG31293	DF+	DNA		21312	WT
<i>rev7</i>	CG2948	UAS-	DNA	U-	108813	WT
<i>RfaBp</i>	CG11064	DF+	Tr	U	100944	WT
<i>robo</i>	CG13521	UAS-	CA		42241	WT
<i>rpk</i>	CG1058	DF-//UAS-	Tr		BL-25847	WT
<i>RpL27</i>	CG4759	DF+//UAS+	R	U	4759R-3	S-P
<i>RpL28</i>	CG12740	DF-//UAS-	R		49124	L/S-P
<i>rpr</i>	CG4319	UAS+	M		12045	WT
<i>Rpt3R</i>	CG9475	DF+	P	U	110309	WT
<i>ry</i>	CG7642	DF+//UAS-	RedOx		106995	WT
<i>sage</i>	CG12952	DF+	DNA	U-	BL-25980	WT
<i>sala</i>	CG4922	DF+	CG	U	BL-33006	WT
<i>salm</i>	CG6464	DF-//UAS-// UAS+	DNA		3029	S-P
<i>salr</i>	CG4881	DF-//UAS-	DNA		28386	P
<i>scaf</i>	CG11066	UAS+	P	S=	11066R-1	S-P
<i>SCAP</i>	CG33131	DF-	P	U=	7317	WT
<i>scb</i>	CG8095	UAS+	CA	U+	8095R-2	WT
<i>scrib</i>	CG42614	UAS+	CA	U-	BL-29552	L/S
<i>sda</i>	CG5518	UAS-	P	U	22145	L/P
<i>Sema-1a</i>	CG18405	UAS+	CGh		18405R-3	WT
<i>sens</i>	CG32120	UAS-	DNA	S=	32120R-1	S-P/N
<i>Sgs7</i>	CG18087	DF+	Cut		8614	WT

TABLA 3 (Continuación)

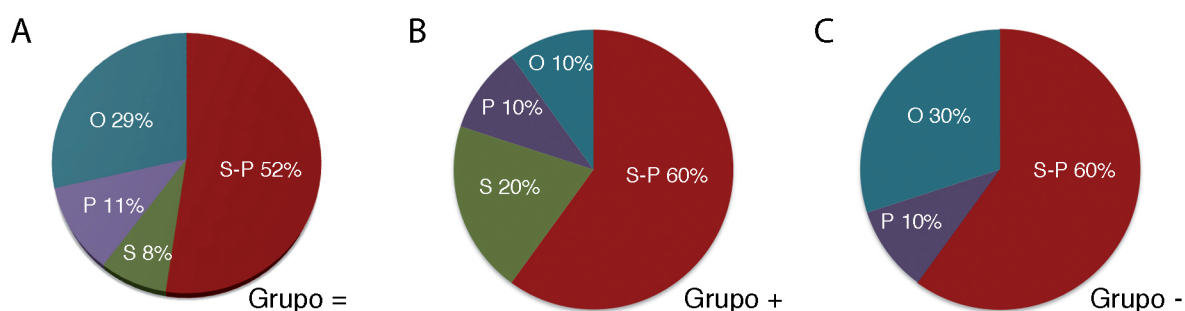
Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
<i>Sgs8</i>	CG6132	DF+	Cut		23526	WT
<i>shn</i>	CG7734	UAS+	DNA	U-	105643	S-P
<i>slow</i>	CG7447	DF+//UAS+	CA		30934	WT
<i>sm</i>	CG9218	UAS+	RNA		108351	S-P
<i>Snap25</i>	CG40452	DF-//DF+//UAS-	CGh		BL-27306	WT
<i>sob</i>	CG3242	UAS+	DNA	S=	3242R-1	L/S-P
<i>Sox14</i>	CG3090	DF+	DNA		BL-26221	WT
<i>SoxN</i>	CG18024	DF+	DNA	U-	BL-25996	WT
<i>SP1029</i>	CG11956	DF+	P		3335	Bs
<i>SPE</i>	CG16705	DF+	P	U-	30972	L/S-P
<i>spn-E</i>	CG3158	DF+	RNA		BL-31620	WT
<i>Spn100A</i>	CG1342	DF+//UAS+	P	SS-	1342R-1	WT
<i>Spn28D</i>	CG7219	DF+	P		106228	WT
<i>Spn42De</i>	CG9460	DF+	P	U-	9460R-3	WT
<i>Spn43Aa</i>	CG12172	UAS+	P	S-	12172R-2	S-P
<i>Spn43Ab</i>	CG1865	DF+	P	U	45315	WT
<i>Spn47C</i>	CG7722	UAS-	P	U-	100328	WT
<i>Spt-I</i>	CG4016	UAS-	P		108833	L/S-P
<i>spz</i>	CG6134	DF+	Sig	U-	BL-28538	WT
<i>stv</i>	CG32130/CG10745	DF-//UAS+	P		10745R-2	S-P
<i>swi2</i>	CG14485	DF-//UAS+	Sig	U-	BL-28530	WT
<i>SytIV</i>	CG10047	DF+//UAS+	Tr	N=	33317	F/S
<i>tej</i>	CG8589	UAS+	DNA	U-	103264	WT
<i>TeplV</i>	CG10363	UAS-	P		13466	P
<i>tey</i>	CG8780	UAS-	DNA	U-	106065	Bs/S
<i>Tie</i>	CG7525	UAS-	P		7525R-2	S-P
<i>Tig</i>	CG11527	DF+	CA		11527R-1	S-P
<i>Timp</i>	CG6281	UAS+	CA	S=	4783	WT
<i>tnc</i>	CG13648	UAS+	CGh		42326	WT
<i>Trim9</i>	CG31721/CG6256	UAS-	CGh	SS-	100767	WT
<i>trio</i>	CG18214	UAS+	Sig		BL-27732	WT

TABLA 3 (Continuación)

Simbolo	CG	Condición	Clase Molec.	H. <i>in situ</i>	Línea ARNi	Fenotipo
<i>Trx-2</i>	CG31884	UAS-	DNA	U-	36297	WT
<i>Tsf1</i>	CG6186	DF+	Tr		6186R-2	Bs
<i>Tsp26A</i>	CG9093	DF+	CGh		9696	WT
<i>Tsp42Ea</i>	CG18817/CG3364	UAS+	CGh		3364R-2	WT
<i>Tsp42Ej</i>	CG12143	DF+	CGh		BL-29392	WT
<i>Tsp42Ek</i>	CG12841	DF+	CGh		8717	WT
<i>TwdIE</i>	CG14534	UAS+	CG	U	24867	WT
<i>TwdIV</i>	CG14640	UAS+	CG		102989	WT
<i>Ubp64E</i>	CG5486	UAS-	P		103743	WT
<i>Ubqn</i>	CG14224	UAS-	P	U=	14224R-1	P
<i>Ude</i>	CG18410	UAS+	DNA	U-	18410R-2	WT
<i>Ugt86Da</i>	CG18578	DF-//UAS-	M		18578R-1	S-P
<i>Ugt86Di</i>	CG6658	DF-//UAS-	M		104262	WT
<i>unc-115</i>	CG31332	UAS+	Cy	U	31332R-2	WT
<i>unc-13</i>	CG2999	DF-//UAS-	Sig	S+	33609	L
<i>vir-1</i>	CG31764	DF-//UAS+	CGh	SS-	102534	WT
<i>vvl</i>	CG10037	UAS-	DNA		BL-26228	P
<i>w</i>	CG2759	UAS+	Sig		BL-28980	S-P
<i>Wnt4</i>	CG4698	UAS+	Sig	S-	4698R-3	S-P/Bs
<i>wrapper</i>	CG10382	UAS+	CGh	U-	10382R-3	WT
<i>wun2</i>	CG8805	UAS+	Tr		BL-32381	WT
<i>Wwox</i>	CG7221	DF-	RedOx		7221R-7	WT
<i>yellow-b</i>	CG17914	UAS+	CGh		17914R-3	WT
<i>yellow-c</i>	CG4182	DF+	CGh		4182R-1	WT
<i>yellow-e</i>	CG9792	UAS+	CGh		100926	F
<i>Zasp66</i>	CG6416	DF-	CGh		102980	WT

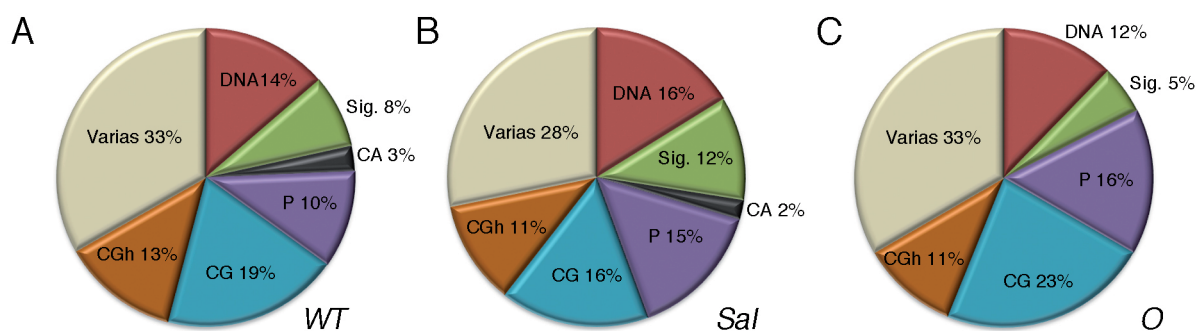
**Tabla 3. Fenotipos generados tras la expresión de ARN interferentes.** Fenotipo silvestre (WT), letal (L), tamaño-patrón (S-P), tamaño (S), patrón (P), ala arrugada (F), adhesión dorsal-ventral (Bs) y defectos en el margen del ala (N). También se muestra la información referente a la línea ARNi utilizada, la condición de los microarrays de los cuales procede cada gen (DF, DF, UAS- y UAS+), las categorías de patrón de expresión: no se expresan (N), se expresan ubicuamente (U), presentan un patrón de expresión restringido a alguna región del disco imaginal de ala (S), muestran un patrón de expresión restringido a la región de ala (SS), seguidos de los signos + (aumenta la expresión), - (disminuye expresión) o = (no varía la expresión) para indicar el comportamiento en discos imaginales mutantes para los genes *sal*, y la clase molecular (Clase Molec.) de cada gen utilizando las abreviaciones de la Tabla 2.

El hecho de que la categoría de fenotipos encontrada en mayor proporción es la que afecta tanto al tamaño como al patrón de ala (S-P), efectos que encontramos tras la reducción de la expresión de los genes *sal* y de su sobre-expresión, nos indica que estos genes podrían estar relacionados funcionalmente con *Sal*. Los genes que presentan fenotipos relacionados únicamente con tamaño (S) o con patrón (P) también podrían estar relacionados funcionalmente con *Sal*. El resto de fenotipos encontrados se agruparon en una categoría única denominada O. Para correlacionar los datos obtenidos mediante los experimentos de hibridación *in situ* con los correspondientes fenotipos obtenidos mediante su ARN-i se agruparon los genes analizados por hibridación *in situ* en tres clases: aquellos que no presentan variación en su expresión más los pertenecientes a las categorías U- y S- (grupo “=”), los que muestran un aumento de expresión en fondo mutante *sal/salr* (grupo “+”) y los que presentan una disminución de expresión en este fondo genético (grupo “-”). Encontramos que el porcentaje de genes que muestran fenotipos S-P es mayor en los grupos “+” y “-” en comparación al del grupo “=”, y que el grupo de fenotipos no relacionados con la falta de *sal* (O) es menos numeroso en la clase de expresión “+”(Figura 51).



**Figura 51. Relación entre fenotipos y patrones de expresión.** (A-C) Porcentaje de fenotipos de tamaño y patrón (S-P), tamaño (S), patrón (P) y otros (O) obtenidos en el conjunto de genes cuya expresión no cambia en fondo mutante para *sal* (A; Grupo =), en los que muestran un aumento en su expresión en fondo mutante para *sal* (B; Grupo +) y en los que muestran una disminución en su expresión en fondo mutante para *sal* (C; Grupo -).

Dado que conocemos los procesos celulares en los cuales están implicadas las proteínas Sal, decidimos estudiar las clases moleculares de los genes cuyo ARN-i fue analizado y así poder determinar si su naturaleza molecular está relacionada con las funciones descritas para las proteínas Sal. Las clases moleculares de interés, según la clasificación realizada anteriormente, son ADN, Sig, CA y P. Se realizaron tres clasificaciones fenotípicas: WT, que representa a los genes cuyo ARN-i produce alas adultas normales, Sal, que agrupa los fenotipos similares a la falta o sobre-expresión de Sal (S, P, S-P) y O, que agrupa el resto de categorías fenotípicas en las que se agruparon los fenotipos encontrados (F, Bs, N y L). Se analizó el porcentaje de las distintas clases moleculares que aparece en cada uno de los grupos (Figura 52), observándose un porcentaje similar en todas las clasificaciones, WT (Figura 52A), Sal (Figura 52B) y O (Figura 52C), indicando que no hay un enriquecimiento en los fenotipos relacionados con la falta o sobre-expresión de Sal con respecto a las clases moleculares con las que podrían estar relacionadas las funciones descritas para las proteínas Sal.



**Figura 52. Relación entre fenotipos y las clases moleculares.** (A-C) Porcentaje de cada clase molecular (DNA: proteínas relacionadas con el ADN; Sig: proteínas relacionadas con la señalización celular; P: proteínas relacionadas con modificaciones post-traduccionales; CG: proteína de naturaleza desconocida; CGh: proteína con algún dominio estructural conservado; Varías: Resto de clases moleculares) en genes sin fenotipo tras expresión de sus ARN-i (A; WT), genes cuyo fenotipo es similar al que muestran la falta o sobre-expresión de las proteínas Sal (B; Sal) y genes que presentan el resto de fenotipos encontrados (C; O).





## Discusión



Las proteínas Sal desempeñan múltiples funciones durante el desarrollo de distintos organismos (de Celis and Barrio, 2009). En *Drosophila* participan en la adquisición de destinos celulares específicos durante el desarrollo embrionario y larvario y durante el desarrollo del ala son necesarias para la formación del patrón de venas, entre otros procesos. Teniendo en cuenta la actividad transcripcional de estas proteínas puede hipotetizarse que estas funciones se realicen a través de la regulación transcripcional de determinados genes diana. En este trabajo se ha realizado el estudio de la función de estas proteínas durante el desarrollo del disco imaginal de ala, extendiendo estudios anteriores que identificaron sus funciones en la regulación del patrón de venas y establecimiento de afinidades celulares (de Celis and Barrio, 2000; Milan et al., 2002). Así, se han caracterizado nuevas implicaciones en supervivencia y división celular y mantenimiento de la integridad epitelial. Además se han identificado qué aspectos de la actividad de la ruta de señalización Dpp son mediados por la actividad de las proteínas Sal. De forma adicional también se ha realizado una primera identificación de genes candidatos a ser regulados por los factores de transcripción Sal durante el desarrollo del ala.

## 1. Función de las proteínas Sal durante el desarrollo del ala

### 1.1. Papel de las proteínas Sal en el mantenimiento de la integridad epitelial y afinidades celulares en la región central del ala y su relación con la ruta de señalización Dpp

El análisis de células mutantes para *sal* y de discos imaginales de ala crecidos con niveles reducidos de las proteínas Sal, ha permitido identificar diferentes funciones de estos genes durante el desarrollo del ala. En primer lugar, se ha observado que la expresión de Sal en el dominio central del ala confiere a estas células una afinidad que las hace diferentes de otras células que no expresan estas proteínas. Así, los clones de falta de función de los genes *sal* en la región central del ala tienen forma redondeada, a diferencia de los clones no mutantes (Milan et al., 2002) y forman invaginaciones en las zonas de contacto de células que expresan y células que no expresan Sal. Además, también se han observado resultados compatibles con cambios en afinidades celulares en grupos de células que sobre-expresan *sal*, ya que éstas células también forman invaginaciones epiteliales en las zonas de contacto entre células que expresan distintos niveles de *sal*. Este último resultado indica un aspecto cuantitativo de esta afinidad celular, ya que un incremento uniforme de la expresión de *sal* en su dominio normal de expresión no afecta a la continuidad epitelial. Esta función de las proteínas Sal fue relacionada con la regulación de las proteínas de membrana Capricious y Tartan (Milan et al., 2002), que son reprimidas por Sal en la región central del ala. De hecho, también se ha identificado que la expresión de la proteína de membrana FasIII es activada por las proteínas Sal en la región central del ala, indicando que las proteínas Sal podrían contribuir de manera directa a la adhesión celular. Los cambios en afinidades celulares también se detectan al realizar confrontaciones de células que expresan distintos niveles de *sal* en los bordes de compartimento A/P y D/V, observándose la formación de grandes surcos epiteliales. Las diferencias entre la región central del ala y las regiones laterales se manifiestan durante el desarrollo normal en forma de restricciones clonales y de respuesta a la señalización de Dpp (Resino et al., 2002; Schwank et al., 2008). Estas diferencias no son suficientes para provocar segregaciones en el epitelio, quizás porque la función de Sal contribuye a equilibrar las afinidades celulares entre el territorio central y los laterales.

La expresión de una forma activada del receptor de la ruta de señalización Dpp,  $Tkv^{Q253D}$ , afecta a la continuidad epitelial. La eliminación de la expresión de los genes *sal* en clones de células que expresan  $Tkv^{Q253D}$  en el dominio central del ala rescata la formación de surcos epiteliales. De igual modo cuando se expresa  $Tkv^{Q253D}$  a lo largo de todo el dominio central del ala a la vez que se elimina la expresión de los genes *sal*, se observan alas que presentan únicamente el efecto causado por la ausencia de dichos genes. Esto indica que los efectos de  $Tkv^{Q253D}$  en

la continuidad epitelial son llevados a cabo a través de las proteínas Sal en el dominio central del ala.

## 1.2. Función de Sal en la división celular y su relación con la ruta Dpp

Las proteínas Sal se requieren para promover la proliferación celular en la región central del ala. El análisis de clones mutantes para *sal* revela que éstos son más pequeños que sus clones hermanos, y cuando se generan clones de falta de *sal* que ocupan el compartimento anterior, posterior o las regiones de intervena del ala (A-E), sus tamaños son menores que los que alcanzarían en un ala normal. De igual modo, al reducir los niveles de cada una de las proteínas Sal (*Salm* y *Salr*) individualmente o a la vez en su dominio normal de expresión, también observamos una reducción del tamaño respecto al de un ala silvestre. En las regiones centrales de estos discos mutantes también se observa una disminución en el número de células en mitosis y una acumulación en la fase G2 del ciclo celular. Durante el desarrollo pupal, las células mutantes para *salm* y *salr* presentan un tamaño mayor que las células silvestres, que podría estar relacionado con un alargamiento del ciclo celular. Todas estas evidencias indican que las proteínas Sal median algunos aspectos de la transición G2/M, probablemente regulando la expresión de los genes encargados de ella. En *Drosophila* la fosfatasa String (*stg*) se requiere en la transición G2/M y para ello desfosforila el complejo CycB/Cdk1 (Edgar and Lehner, 1996). En este trabajo se observa que la expresión de *stg* se ve reducida en la región central del ala en discos imaginales mutantes para *salm/salr*, pero que la sobre-expresión de dicha proteína no rescata los defectos de proliferación observados en alas mutantes para los genes *sal*. Esto indica que las proteínas Sal regulan aspectos de la transición G2/M independientes a la expresión de *stg*.

La ruta de señalización Dpp regula el crecimiento del disco imaginal de ala por represión de la expresión de *brk*, y se ha propuesto que el sistema Dpp/Brk limita la proliferación en las regiones laterales del disco imaginal de ala (Schwank et al., 2008). Se ha observado que los aspectos del sistema Dpp/Brk que actuarían sobre el crecimiento del disco son independientes de la actividad de Sal, ya que clones de células que expresan Tkv<sup>Q253D</sup>, que presentan una falta de expresión de *brk* y la expresión ectópica de los genes *sal*, sobre-crecen en las regiones periféricas del disco de ala en ausencia de los genes *sal*. Sin embargo, la presencia de Sal sí rescata la falta de proliferación de células mutantes *tkv* en la región central del ala, sugiriendo que en este territorio Sal media la actividad Dpp/Tkv. El análisis de células mutantes *tkv* muestra una reducción en el número de células en las fases S y G2 del ciclo y un incremento en el número de células en la fase G1 (Edgar et al., 2001). Estos datos indican un comportamiento distinto al de las células mutantes *sal*, las cuales tienden a acumularse en la fase G2 del ciclo celular. Es-

tos datos parecen indicar que la ruta de señalización Dpp regula las transiciones G1/S y G2/M mediante mecanismos distintos, y que Sal sólo participaría en la función de Dpp necesaria para la transición G2/M.

### 1.3. Función de Sal en la supervivencia celular

Las proteínas Sal también se requieren para la viabilidad celular en la región central del ala. La reducción de la expresión de los genes *sal* está asociada a la activación de la ruta de señalización JNK y a la inducción de muerte celular, aunque estos dos eventos tienen una contribución menor a la generación del fenotipo mutante de *sal*. Así, cuando la muerte celular o la actividad de la ruta de señalización JNK se reprime en discos de ala mutantes para *sal*, las alas resultantes son más pequeñas de lo normal y presentan defectos similares en el patrón de venas a los observados en alas mutantes para *sal*. No se conocen los mecanismos que relacionan a las proteínas Sal con la actividad de la ruta JNK y la muerte celular. Se sabe que en los surcos epiteliales generados por la falta de actividad de Tkv se activa la ruta de señalización JNK y muerte celular (Gibson and Perrimon, 2005), y esta muerte no está relacionada con la extrusión epitelial. En este trabajo hemos observado que la expresión de *puc* ocurre en discos donde se reduce la expresión de *sal* en el compartimento posterior, donde observamos la formación de un surco epitelial, pero también lo observamos en situaciones donde la apariencia del epitelio es normal, cuando se reduce *sal* en todo el dominio de expresión de éstos genes, lo que podría sugerir una relación mas directa entre Sal y la regulación de la ruta JNK.

### 1.4. Sal no participa en la diferenciación de venas mediada por la ruta Dpp

La ruta de señalización Dpp también está implicada en la correcta formación del patrón de venas. La falta de la actividad de la ruta al reducir la expresión de Mad en la región central del ala, genera alas que presentan defectos en la diferenciación de venas. Este defecto es suprimido por la sobre-expresión de las proteínas Sal. El exceso de actividad de la ruta, sobre-expresando Dpp en el dominio central del ala, genera alas con venas ectópicas. Sin embargo, la reducción de las proteínas Sal en esta situación no suprime el exceso de venas ectópicas en el ala. Por tanto, las proteínas Sal median, en parte, los efectos de la ruta Dpp sobre la formación del patrón de venas del ala, probablemente estando restringida su participación al desarrollo larvario, momento en el que se definen las regiones presuntivas de las venas.



## 2. *omb* y los genes *sal*

El gen *omb* es activado directamente en el disco imaginal de ala por la ruta de señalización Dpp y participa en la regulación de los genes *sal* y en el mantenimiento de la integridad epitelial del disco imaginal de ala (Grimm and Pflugfelder, 1996; del Alamo Rodriguez et al., 2004; Shen et al., 2010; Shen et al., 2008). Se ha observado que las proteínas Sal también participan en dicho proceso. Dado que *omb* participa en la activación de los genes *sal* cabría esperar que la implicación del gen *omb* en el mantenimiento de la integridad epitelial fuera llevada a cabo por los genes *sal*. La reducción de expresión tanto de los genes *sal* como del gen *omb* individualmente genera defectos en la continuidad epitelial. La expresión de *omb* es independiente de Sal, y la de *sal* es también independiente de Omb en nuestras condiciones experimentales, indicando que la formación del surco epitelial se genera tanto al reducir uno u otro gen. Además, de igual modo que se ha visto para los genes *sal*, la eliminación de la expresión del gen *omb* suprime los efectos de la presencia de Tk<sup>v</sup><sup>Q253D</sup> en el dominio central del ala, pero este rescate se observa únicamente en el ala adulta, los efectos observados en la discontinuidad epitelial en el disco imaginal se siguen observando tras la reducción del gen *omb*, indicando que estos efectos se rescatan más tarde en el desarrollo. Estos resultados indican que los efectos de Tk<sup>v</sup><sup>Q253D</sup> en la continuidad epitelial son llevados a cabo a través de las proteínas Sal y Omb, y que éstos podrían actuar de manera independiente o complementaria.

## 3. Análisis de los perfiles de expresión génica en discos imaginales de ala mediante microarrays

Las funciones de Sal en la regulación de la división celular, viabilidad, integridad epitelial y posicionamiento de las venas indican que estas proteínas podrían actuar sobre un gran número de genes diana. El uso de microarrays permite identificar genes que se expresan diferencialmente en un tejido concreto a un tiempo determinado y en distintas condiciones experimentales. Ejemplos de su utilización son la identificación de genes que presentan diferencias en sus niveles de expresión en tejidos mutantes frente a silvestres (Akdemir et al., 2007), genes que se expresan diferencialmente en distintos tejidos o qué genes se expresan durante diferentes etapas del desarrollo (Stathopoulos and Levine, 2002; White et al., 1999). Así, por ejemplo, en *Drosophila melanogaster* mediante la utilización de microarrays se identificaron genes que se expresan diferencialmente en las distintas regiones que componen el disco imaginal de ala (Butler et al., 2003). Para identificar qué genes son regulados por Sal en el dominio central del ala hemos comparado los perfiles de expresión de discos de ala mutantes para *salm* y *salr* (DF) y de discos en los que se sobre-expresa *salm* (UAS) con los perfiles de expresión de discos imaginales control.

### 3.1. Resultados de los microarrays de falta y ganancia de función de los genes *sal*

Se han identificado 139 genes cuyos niveles de expresión disminuyen respecto a discos imaginales de ala silvestres (DF-) y 189 genes en los que su expresión aumenta (DF+). En condiciones de sobre-expresión de los genes *sal* se identificaron 205 genes que disminuyen sus niveles de expresión (UAS-) y 239 genes que los aumentan (UAS+). Dentro de los genes DF- se ha visto que los genes *sal* disminuyen su expresión con valores de “fold change” de 2,11 para *salm* y 2,25 para *salr*, indicando que estos valores de “fold change” son adecuados para identificar cambios muy sustanciales de expresión. En el caso de los experimentos de sobre-expresión de *salm* la situación es más compleja, ya que se encuentra a *salm* tanto en la clase UAS+, con un valor de “fold change” 2,03, como cabría esperar, pero también se identifica en la clase UAS-, con un valor de “fold change” de 3,78 para *salm* y 4,39 para *salr*. Este último dato podría deberse a la diferencia de tamaño de la región de ala respecto a la región del tórax en los discos UAS-*salm*. Este comportamiento se podría producir en otros genes seleccionados, y por ello se han realizado otras aproximaciones experimentales para validar los datos de los microarrays.

Los genes identificados se agruparon según su naturaleza molecular. En cada una de las condiciones analizadas (DF y UAS) se ha observado una representación similar de las diferentes agrupaciones moleculares, encontrando en todas ellas un porcentaje elevado de genes de naturaleza desconocida (CG y CGh). Las clases moleculares relacionadas con la regulación transcripcional (ADN), metabolismo de proteínas (P) y señalización celular (Sig), clases moleculares relacionadas con las funciones que realizan las proteínas Sal, aparecen con un porcentaje representativo (ADN 11-18%, P 8-12 % y Sig 8-9%).

### 3.2. Patrones de expresión de los genes identificados

Es de esperar que los genes identificados en los microarrays presenten cambios en sus patrones de expresión al variar la expresión de los genes *sal*, al menos en la región del ala donde se expresan las proteínas Sal. Por ello se realizaron hibridaciones *in situ* de un total de 249 de estos genes, y de 197 de ellos también analizamos su patrón de expresión en discos imaginales de ala donde se redujo la expresión de los genes *sal*. Entre estos 197 casos encontramos 49 que no varían su expresión al eliminar los genes *sal*, 23 que aumentan su expresión y 19 que disminuyen su expresión. Cabría esperar que los resultados obtenidos en los patrones de expresión coincidan con las variaciones en los niveles de expresión detectadas en los microarrays. Sin embargo, al analizar estos valores se ha encontrado que de los genes cuya expresión analizada mediante hibridación *in situ* aumenta en mutantes *sal*, sólo el 26%

coinciden con genes identificados como DF+. Entre los genes que disminuyen su expresión en experimentos de *in situ* en discos mutantes *sal* también se ha encontrado un 26% de coincidencia con los datos de los microarrays de la deficiencia de los genes *sal* (genes de la clase DF-). La falta de coincidencia observada podría ser debida a que los discos utilizados para la realización de los microarrays y para el análisis de los patrones de expresión corresponden a genotipos completamente distintos. En el primer caso se realizaron clones de una deficiencia que elimina los genes *salm* y *salr*, generándose confrontaciones de células que expresan y no expresan *sal*, mientras que para las hibridaciones *in situ* se utilizaron discos de ala en los que la expresión de *salm* y *salr* se reduce en todo el dominio central del ala por igual. Teniendo en cuenta estos aspectos, se han seleccionado como genes candidatos a ser regulados por las proteínas Sal los genes que varían su patrón de expresión mediante hibridación *in situ*. Así, se puede identificar un total de 42 genes, de los que 23 estarían reprimidos por las proteínas Sal y 19 estarían activados por estas proteínas.

### 3.3. Sitios de unión al ADN de los factores de transcripción Sal

Las proteínas Sal son factores de transcripción y como tales podrían actuar uniéndose a secuencias específicas del ADN. Por ello se compararon las secuencias de unión al ADN descritas para las proteínas Sal con los 1000 pares de bases precedentes al sitio de inicio de la transcripción (TSS) de los 42 genes candidatos a ser regulados por las proteínas Sal y de 41 genes control que no variaron su expresión en el análisis de hibridación *in situ*. Para ello se generaron tres modelos de predicción de secuencias de unión para Sal, encontrando que únicamente el Modelo 1 (el cual se basa en una secuencia de unión descrita para *Salr*) identifica un porcentaje superior de sitios de unión conservados (16,7%) con respecto al control (3,2%). Aún así, el porcentaje de sitios de unión encontrados es relativamente bajo, lo que podría ser debido a que únicamente analizamos 1000 pares de bases TSS. Cabría esperar que los sitios de unión estuvieran localizados en regiones mucho más alejadas del TSS o incluso en intrones del propio gen.

### 3.4. Fenotipos de falta de función de los genes encontrados en los microarrays

#### 3.4.1. Clasificación de los genes según su fenotipo

El estudio de los fenotipos de ala generados por la reducción de la expresión de un gen da información acerca de su requerimiento durante el desarrollo del ala. Dado que se conocen los fenotipos producidos tanto por la falta de función de los genes *sal* como de su sobre-expresión, se realizó un estudio de los fenotipos en el ala producidos por la reducción

de la expresión de los genes identificados en los microarrays. Este estudio es una aproximación complementaria para la identificación de genes candidatos a participar en las funciones de Sal, siendo más interesantes los fenotipos más parecidos a los producidos por la ganancia o falta de función de Sal.

Se analizó el fenotipo de falta de función de 491 genes. En el 60% de los casos no se encontró ningún fenotipo, es decir, tras la reducción de la expresión de esos genes el ala no presenta ninguna modificación en su tamaño, forma o patrón de diferenciación. De los genes cuya reducción de expresión produce alteraciones en el ala se obtuvo un 48% de fenotipos de modificación del tamaño del ala y del patrón de venas (S-P), un 13% de fenotipos en los que el ala esta reducida en tamaño (S) y un 11% de fenotipos donde fundamentalmente se afecta el patrón de venas (P). Estos fenotipos están relacionados con los observados tras la falta o ganancia de función de los genes *sal*. El 28% de casos restantes corresponde a fenotipos no relacionados con los causados por las proteínas Sal, tales como defectos en el margen de ala, polaridad celular o adhesión entre las superficies dorsal y ventral del ala.

### 3.4.2. Relación de los fenotipos encontrados con los patrones de expresión de los genes analizados

El análisis de los fenotipos producidos por la falta de función de genes aporta información sobre su función. Sin embargo, para poder relacionarlos con su posible regulación por las proteínas Sal se correlacionaron los datos obtenidos mediante los experimentos de hibridación *in situ* con los fenotipos de falta de función obtenidos mediante su ARN-i. En los casos en los que el patrón de expresión no varía en fondo mutante para *sal* se observó que en un 52% de los casos presentan un fenotipo de S-P, y en los casos de los genes cuyo patrón de expresión aumentaba o disminuía en fondo mutante para los genes *sal* se observó un porcentaje algo mayor de este tipo de fenotipos (60%), indicando que mediante el estudio fenotípico se pueden encontrar genes relacionados funcionalmente con las proteínas Sal.

### 3.4.3. Relación de los fenotipos encontrados y las clases moleculares de los genes

Dado que se ha encontrado una representación elevada en los microarrays de las clases moleculares relacionadas con las funciones descritas para las proteínas Sal, cabría esperar que los genes identificados mediante el análisis de fenotipos pertenezcan a las clases moleculares relacionadas con las funciones de las proteínas Sal. Sin embargo, se observa un porcentaje similar de cada una de las clases moleculares en cada agrupación fenotípica, indicando que no hay una representación mayoritaria de ninguna clase molecular entre los genes cuyo fenotipo

de falta de función podría indicar una relación con Sal.

Las funciones de Sal en la regulación de la división celular, viabilidad, integridad epitelial y posicionamiento de las venas indica que estas proteínas regulan muchos de los aspectos del patrón de la región central del ala y que actúan como genes mediadores de la actividad de la ruta Dpp. La identificación de los genes que son regulados transcripcionalmente por estas proteínas daría una idea de qué proteínas son las mediadoras de las funciones descritas para las proteínas Sal. Mediante la utilización de microarrays se han identificado genes candidatos para realizar dichas funciones. El análisis de las regiones reguladoras de estos genes y su caracterización funcional dará una idea de su función en el desarrollo del disco imaginal de ala y su posible regulación transcripcional a través de las proteínas Sal.



## Conclusiones





1. Las proteínas Sal están implicadas en el mantenimiento de la integridad epitelial y de las afinidades celulares en la región central del ala. Los efectos causados por la expresión de una forma activada del receptor Tkv en la continuidad epitelial son llevados a cabo a través de las proteínas Sal en el dominio central del ala.
2. Las proteínas Sal promueven la progresión del ciclo celular regulando la transición G2/M. Esta regulación es llevada a cabo de manera independiente de la fosfatasa String. La falta de proliferación de células mutantes *tkv* en la región central del ala es rescatada en presencia de las proteínas Sal.
3. La falta de las proteínas Sal induce muerte celular en la región central del ala. Esto indica que las proteínas Sal se requieren para la viabilidad celular en la región central del ala y que esta función podría estar relacionada con la regulación de la ruta JNK.
4. La sobre-expresión de las proteínas Sal corrige en gran medida los defectos en la diferenciación de venas generados por la falta de función de la ruta Dpp. La falta de expresión de los genes *sal* no suprime la formación de venas ectópicas generadas por la ganancia de función de la ruta Dpp. Por tanto, las proteínas Sal participan en la formación del patrón de venas mediada por la ruta Dpp durante el desarrollo larvario.
5. Las proteínas Sal actúan de manera independiente a la proteína Omb.
6. A través del análisis de microarrays en condiciones de falta y ganancia de función de los genes *sal* se han identificado 139 genes cuyos niveles de expresión disminuyen en la falta de los genes *sal* y 189 genes que aumentan su expresión. En condiciones de ganancia de función de los genes *sal* se han identificado 205 genes que disminuyen sus niveles de expresión y 239 genes que los aumentan.
7. Mediante el estudio de los patrones de expresión de 249 genes identificados en los microarrays, se han identificado 42 genes candidatos a ser regulados por las proteínas Sal, 23 estarían reprimidos y 19 activados.
8. El estudio comparativo de los 1000 pb precedentes al sitio de inicio de la transcripción de los 42 genes candidatos a ser regulados por las proteínas Sal, con la secuencia de unión al ADN descrita para la proteína Salr, revela un 16,7% de sitios de unión conservados en dichas regiones.

9. En el estudio de los fenotipos de falta de función de 491 genes identificados en los microarrays encontramos un 60% de fenotipos silvestres. Un 72% de los genes cuya reducción de su expresión produce alteraciones en el ala causan fenotipos relacionados con la falta o ganancia de función de los genes *sal*.
10. El 60% de los genes varían su expresión en fondo mutante para *sal* producen fenotipos que afectan el tamaño y el patrón de venas del ala (S-P), que están relacionados con la falta y ganancia de función de los genes *sal*. Los genes que presentan un fenotipo relacionado con la falta y ganancia de los genes *sal* y los que no lo presentan, se encuentran representados de manera similar en las distintas clases moleculares analizadas.





## Bibliografía





**Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**, 2185-95.

**Abarca-Buis, R. F., Garciadiego-Cázares, D. and Chimal-Monroy, J.** (2006). Mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de la extremidad de los vertebrados. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas* **9**, 78-89.

**Affolter, M. and Basler, K.** (2007). The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* **8**, 663-74.

**Akdemir, F., Christich, A., Sogame, N., Chapo, J. and Abrams, J. M.** (2007). p53 directs focused genomic responses in *Drosophila*. *Oncogene* **26**, 5184-93.

**Al-Baradie, R., Yamada, K., St Hilaire, C., Chan, W. M., Andrews, C., McIntosh, N., Nakano, M., Martonyi, E. J., Raymond, W. R., Okumura, S. et al.** (2002). Duane radial ray syndrome (Okihiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in *SALL4*, a new member of the SAL family. *Am J Hum Genet* **71**, 1195-9.

**Arnone, M. I. and Davidson, E. H.** (1997). The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* **124**, 1851-64.

**Baonza, A., Roch, F. and Martin-Blanco, E.** (2000). DER signaling restricts the boundaries of the wing field during *Drosophila* development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7331-5.

**Barrio, R. and de Celis, J. F.** (2004). Regulation of spalt expression in the *Drosophila* wing blade in response to the Decapentaplegic signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6021-6.

**Barrio, R., de Celis, J. F., Bolshakov, S. and Kafatos, F. C.** (1999). Identification of regulatory regions driving the expression of the *Drosophila* spalt complex at different developmental stages. *Dev Biol* **215**, 33-47.

**Barrio, R., Martin, J. S., Carulli, J., Lipkow, K., Gaul, U., Frommer, G., Schuh, R., Jäckle, H. and Kafatos, F. C.** (1996). The spalt-related gene of *Drosophila melanogaster* is a member of a ancient gene family, defined by the adjacent, region-specific homeotic gene spalt. *Dev Genes Evol* **206**, 315-325.

**Basler, K. and Struhl, G.** (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* **368**, 208-14.

**Blair, S. S.** (1995). Compartments and appendage development in *Drosophila*. *Bioessays* **17**, 299-309.

**Blanco, E., Messeguer, X., Smith, T. F. and Guigo, R.** (2006). Transcription factor map alignment of promoter regions. *PLoS Comput Biol* **2**, e49.

**Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.

**Bray, S. J.** (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 678-89.

- Buck, A., Kispert, A. and Kohlhase, J.** (2001). Embryonic expression of the murine homologue of SALL1, the gene mutated in Townes--Brocks syndrome. *Mech Dev* **104**, 143-6.
- Burke, R. and Basler, K.** (1996). Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing Drosophila wing. *Development* **122**, 2261-9.
- Butler, M. J., Jacobsen, T. L., Cain, D. M., Jarman, M. G., Hubank, M., Whittle, J. R., Phillips, R. and Simcox, A.** (2003). Discovery of genes with highly restricted expression patterns in the Drosophila wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* **130**, 659-70.
- Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G.** (1996). Visualization of gene expression in living adult Drosophila. *Science* **274**, 252-5.
- Campbell, G. and Tomlinson, A.** (1999). Transducing the Dpp morphogen gradient in the wing of Drosophila: regulation of Dpp targets by brinker. *Cell* **96**, 553-62.
- Cantera, R., Luer, K., Rusten, T. E., Barrio, R., Kafatos, F. C. and Technau, G. M.** (2002). Mutations in spalt cause a severe but reversible neurodegenerative phenotype in the embryonic central nervous system of Drosophila melanogaster. *Development* **129**, 5577-86.
- Chien, A. J., Conrad, W. H. and Moon, R. T.** (2009). A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J Invest Dermatol* **129**, 1614-27.
- Cohen, B., McGuffin, M. E., Pfeifle, C., Segal, D. and Cohen, S. M.** (1992). apterous, a gene required for imaginal disc development in Drosophila encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes Dev* **6**, 715-29.
- Cohen, B., Simcox, A. A. and Cohen, S. M.** (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the Drosophila embryo. *Development* **117**, 597-608.
- Cook, O., Biehs, B. and Bier, E.** (2004). brinker and optomotor-blind act coordinately to initiate development of the L5 wing vein primordium in Drosophila. *Development* **131**, 2113-24.
- Crick, F. H. and Lawrence, P. A.** (1975). Compartments and polyclones in insect development. *Science* **189**, 340-7.
- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M. and de Celis, J. F.** (2009). A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the Drosophila melanogaster wing. *Genetics* **183**, 1005-26.
- de Celis, J. F.** (2003). Pattern formation in the Drosophila wing: The development of the veins. *Bioessays* **25**, 443-51.
- de Celis, J. F. and Barrio, R.** (2000). Function of the spalt/spalt-related gene complex in positioning the veins in the Drosophila wing. *Mech Dev* **91**, 31-41.
- de Celis, J. F. and Barrio, R.** (2009). Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *Int J Dev Biol* **53**, 1385-98.
- de Celis, J. F., Barrio, R. and Kafatos, F. C.** (1996a). A gene complex acting downstream of dpp in Drosophila wing morphogenesis. *Nature* **381**, 421-4.

**de Celis, J. F., Barrio, R. and Kafatos, F. C.** (1999). Regulation of the spalt/spalt-related gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development* **126**, 2653-62.

**de Celis, J. F., de Celis, J., Ligoxygakis, P., Preiss, A., Delidakis, C. and Bray, S.** (1996b). Functional relationships between Notch, Su(H) and the bHLH genes of the E(spl) complex: the E(spl) genes mediate only a subset of Notch activities during imaginal development. *Development* **122**, 2719-28.

**del Alamo Rodriguez, D., Terriente Felix, J. and Diaz-Benjumea, F. J.** (2004). The role of the T-box gene optomotor-blind in patterning the *Drosophila* wing. *Dev Biol* **268**, 481-92.

**Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1993). Interaction between dorsal and ventral cells in the imaginal disc directs wing development in *Drosophila*. *Cell* **75**, 741-52.

**Diaz-Benjumea, F. J. and Cohen, S. M.** (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorsal/ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 4215-25.

**Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K. C., Barinova, Y., Fellner, M., Gasser, B., Kinsey, K., Oppel, S., Scheiblaue, S. et al.** (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**, 151-6.

**Domingos, P. M., Brown, S., Barrio, R., Ratnakumar, K., Frankfort, B. J., Mardon, G., Steller, H. and Mollereau, B.** (2004a). Regulation of R7 and R8 differentiation by the spalt genes. *Dev Biol* **273**, 121-33.

**Domingos, P. M., Mlodzik, M., Mendes, C. S., Brown, S., Steller, H. and Mollereau, B.** (2004b). Spalt transcription factors are required for R3/R4 specification and establishment of planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Development* **131**, 5695-702.

**Dong, P. D., Todi, S. V., Eberl, D. F. and Boekhoff-Falk, G.** (2003). *Drosophila* spalt/spalt-related mutants exhibit Townes-Brocks' syndrome phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10293-8.

**Duboc, V. and Logan, M. P.** (2009). Building limb morphology through integration of signalling modules. *Curr Opin Genet Dev* **19**, 497-503.

**Duffy, J. B., Harrison, D. A. and Perrimon, N.** (1998). Identifying loci required for follicular patterning using directed mosaics. *Development* **125**, 2263-71.

**Edgar, B. A., Britton, J., de la Cruz, A. F., Johnston, L. A., Lehman, D., Martin-Castellanos, C. and Prober, D.** (2001). Pattern- and growth-linked cell cycles in *Drosophila* development. *Novartis Found Symp* **237**, 3-12; discussion 12-8, 36-42.

**Edgar, B. A. and Lehner, C. F.** (1996). Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* **274**, 1646-52.

**Edgar, B. A. and O'Farrell, P. H.** (1990). The three postblastoderm cell cycles of *Drosophila* embryogenesis are regulated in G2 by string. *Cell* **62**, 469-80.

**Entchev, E. V., Schwabedissen, A. and Gonzalez-Gaitan, M.** (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* **103**, 981-91.

**Fristrom, D. K. a. F., J. W.** (1993). The metamorphic development of the adult epidermis- in the The development of *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*, 888-889.

**Galko, M. J. and Krasnow, M. A.** (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. *PLoS Biol* **2**, E239.

**Garcia-Bellido, A. and de Celis, J. F.** (1992). Developmental genetics of the venation pattern of *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **26**, 277-304.

**Garcia-Bellido, A., Ripoll, P. and Morata, G.** (1973). Developmental compartmentalisation of the wing disk of *Drosophila*. *Nat New Biol* **245**, 251-3.

**Gibson, M. C. and Perrimon, N.** (2005). Extrusion and death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing. *Science* **307**, 1785-9.

**Gould, A. P., Elstob, P. R. and Brodu, V.** (2001). Insect oenocytes: a model system for studying cell-fate specification by Hox genes. *J Anat* **199**, 25-33.

**Grimm, S. and Pflugfelder, G. O.** (1996). Control of the gene optomotor-blind in *Drosophila* wing development by decapentaplegic and wingless. *Science* **271**, 1601-4.

**Hidalgo, A.** (1998). Growth and patterning from the engrailed interface. *Int J Dev Biol* **42**, 317-24.

**Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T. and Miura, M.** (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J* **21**, 3009-18.

**Irvine, K. D. and Vogt, T. F.** (1997). Dorsal-ventral signaling in limb development. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 867-76.

**Ito, K., Awano, W., Suzuki, K., Hiromi, Y. and Yamamoto, D.** (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**, 761-71.

**Jacinto, A., Woolner, S. and Martin, P.** (2002). Dynamic analysis of dorsal closure in *Drosophila*: from genetics to cell biology. *Dev Cell* **3**, 9-19.

**Jazwinska, A., Kirov, N., Wieschaus, E., Roth, S. and Rushlow, C.** (1999). The *Drosophila* gene brinker reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell* **96**, 563-73.

**Kallio, J., Leinonen, A., Ulvila, J., Valanne, S., Ezekowitz, R. A. and Ramet, M.** (2005). Functional analysis of immune response genes in *Drosophila* identifies JNK pathway as a regulator of antimicrobial peptide gene expression in S2 cells. *Microbes Infect* **7**, 811-9.

**Kim, J., Irvine, K. D. and Carroll, S. B.** (1995). Cell recognition, signal induction, and symmetrical gene activation at the dorsal-ventral boundary of the developing *Drosophila* wing. *Cell* **82**, 795-

802.

**Kohlhase, J., Hausmann, S., Stojmenovic, G., Dixkens, C., Bink, K., Schulz-Schaeffer, W., Altmann, M. and Engel, W.** (1999). SALL3, a new member of the human spalt-like gene family, maps to 18q23. *Genomics* **62**, 216-22.

**Kohlhase, J., Heinrich, M., Schubert, L., Liebers, M., Kispert, A., Laccone, F., Turnpenny, P., Winter, R. M. and Reardon, W.** (2002). Okihiro syndrome is caused by SALL4 mutations. *Hum Mol Genet* **11**, 2979-87.

**Kohlhase, J., Schuh, R., Dowe, G., Kuhnlein, R. P., Jackle, H., Schroeder, B., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H. A., Kohler, A., Muller, U. et al.** (1996). Isolation, characterization, and organ-specific expression of two novel human zinc finger genes related to the Drosophila gene spalt. *Genomics* **38**, 291-8.

**Kohlhase, J., Wischermann, A., Reichenbach, H., Froster, U. and Engel, W.** (1998). Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet* **18**, 81-3.

**Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. and Simon, M.** (1985). The engrailed locus of Drosophila: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* **40**, 45-53.

**Kuhnlein, R. P., Frommer, G., Friedrich, M., Gonzalez-Gaitan, M., Weber, A., Wagner-Bernholz, J. F., Gehring, W. J., Jackle, H. and Schuh, R.** (1994). spalt encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the Drosophila embryo. *EMBO J* **13**, 168-79.

**Kuhnlein, R. P. and Schuh, R.** (1996). Dual function of the region-specific homeotic gene spalt during Drosophila tracheal system development. *Development* **122**, 2215-23.

**Lawrence, P. A. and Struhl, G.** (1996). Morphogens, compartments, and pattern: lessons from drosophila? *Cell* **85**, 951-61.

**Lecuit, T., Brook, W. J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H. and Cohen, S. M.** (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the Drosophila wing. *Nature* **381**, 387-93.

**Lee, T. and Luo, L.** (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for Drosophila neural development. *Trends Neurosci* **24**, 251-4.

**Li, D., Tian, Y., Ma, Y. and Benjamin, T.** (2004). p150(Sal2) is a p53-independent regulator of p21(WAF1/CIP). *Mol Cell Biol* **24**, 3885-93.

**Lupo, G., Harris, W. A. and Lewis, K. E.** (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* **7**, 103-14.

**Manjon, C., Sanchez-Herrero, E. and Suzanne, M.** (2007). Sharp boundaries of Dpp signalling trigger local cell death required for Drosophila leg morphogenesis. *Nat Cell Biol* **9**, 57-63.

**Martin, F. A., Perez-Garijo, A., Moreno, E. and Morata, G.** (2004). The brinker gradient controls wing growth in Drosophila. *Development* **131**, 4921-30.

**Martin-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A. M. and Martinez-Arias, A.** (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 557-70.

**Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C. and Garcia-Bellido, A.** (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7888-93.

**Marty, T., Muller, B., Basler, K. and Affolter, M.** (2000). Schnurri mediates Dpp-dependent repression of brinker transcription. *Nat Cell Biol* **2**, 745-9.

**Massague, J. and Wotton, D.** (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* **19**, 1745-54.

**Micchelli, C. A., Rulifson, E. J. and Blair, S. S.** (1997). The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, Wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate. *Development* **124**, 1485-95.

**Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A.** (1997). Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5691-6.

**Milan, M., Perez, L. and Cohen, S. M.** (2002). Short-range cell interactions and cell survival in the *Drosophila* wing. *Dev Cell* **2**, 797-805.

**Minami, M., Kinoshita, N., Kamoshida, Y., Tanimoto, H. and Tabata, T.** (1999). brinker is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* **398**, 242-6.

**Mohler, J., Seecoomar, M., Agarwal, S., Bier, E. and Hsai, J.** (2000). Activation of knot (kn) specifies the 3-4 intervein region in the *Drosophila* wing. *Development* **127**, 55-63.

**Mollereau, B., Dominguez, M., Webel, R., Colley, N. J., Keung, B., de Celis, J. F. and Desplan, C.** (2001). Two-step process for photoreceptor formation in *Drosophila*. *Nature* **412**, 911-3.

**Molnar, C., Resnik-Docampo, M., Organista, M. F., Martín, M., F-Havia, C. and de Celis J. F.** (2011). Signalling Pathways in Development and Human Disease: A *Drosophila* Wing Perspective *Human Genetic Diseases*, ISBN 978-953-307-936-3, 1-36.

**Moussian, B. and Roth, S.** (2005). Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo--shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr Biol* **15**, R887-99.

**Muller, B., Hartmann, B., Pyrowolakis, G., Affolter, M. and Basler, K.** (2003). Conversion of an extracellular Dpp/BMP morphogen gradient into an inverse transcriptional gradient. *Cell* **113**, 221-33.

**Neff, A. W., King, M. W., Harty, M. W., Nguyen, T., Calley, J., Smith, R. C. and Mescher, A. L.** (2005). Expression of *Xenopus* XISALL4 during limb development and regeneration. *Dev Dyn* **233**, 356-67.



**Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. and Basler, K.** (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-68.

**Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Scully, S., Lacey, D. L. et al.** (2001). Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* **128**, 3105-15.

**Nolo, R., Abbott, L. A. and Bellen, H. J.** (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* **102**, 349-62.

**Nusinow, D., Greenberg, L. and Hatini, V.** (2008). Reciprocal roles for bowl and lines in specifying the peripodial epithelium and the disc proper of the *Drosophila* wing primordium. *Development* **135**, 3031-41.

**O'Farrell, P. H., Edgar, B. A., Lakich, D. and Lehner, C. F.** (1989). Directing cell division during development. *Science* **246**, 635-40.

**Pastor-Pareja, J. C., Grawe, F., Martin-Blanco, E. and Garcia-Bellido, A.** (2004). Invasive cell behavior during *Drosophila* imaginal disc eversion is mediated by the JNK signaling cascade. *Dev Cell* **7**, 387-99.

**Pastor-Pareja, J. C., Wu, M. and Xu, T.** (2008). An innate immune response of blood cells to tumors and tissue damage in *Drosophila*. *Dis Model Mech* **1**, 144-54; discussion 153.

**Perez-Garijo, A., Martin, F. A. and Morata, G.** (2004). Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* **131**, 5591-8.

**Resino, J., Salama-Cohen, P. and Garcia-Bellido, A.** (2002). Determining the role of patterned cell proliferation in the shape and size of the *Drosophila* wing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7502-7.

**Riesgo-Escovar, J. R., Jenni, M., Fritz, A. and Hafen, E.** (1996). The *Drosophila* Jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes Dev* **10**, 2759-68.

**Rogulja, D. and Irvine, K. D.** (2005). Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell* **123**, 449-61.

**Ruiz-Gomez, A., Molnar, C., Holguin, H., Mayor, F., Jr. and de Celis, J. F.** (2007). The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 901-12.

**Rulifson, E. J. and Blair, S. S.** (1995). Notch regulates wingless expression and is not required for reception of the paracrine wingless signal during wing margin neurogenesis in *Drosophila*. *Development* **121**, 2813-24.

**Sanchez, J., Talamillo, A., Gonzalez, M., Sanchez-Pulido, L., Jimenez, S., Pirone, L., Sutherland, J. D. and Barrio, R.** (2011). *Drosophila* Sal and Salr are transcriptional repressors. *Biochem J* **438**, 437-45.



**Sanchez, J., Talamillo, A., Lopitz-Otsoa, F., Perez, C., Hjerpe, R., Sutherland, J. D., Herboso, L., Rodriguez, M. S. and Barrio, R.** (2010). Sumoylation modulates the activity of Spalt-like proteins during wing development in *Drosophila*. *J Biol Chem* **285**, 25841-9.

**Schonbauer, C., Distler, J., Jahrling, N., Radolf, M., Dodt, H. U., Frasch, M. and Schnorrer, F.** (2011). Spalt mediates an evolutionarily conserved switch to fibrillar muscle fate in insects. *Nature* **479**, 406-9.

**Schwank, G. and Basler, K.** (2010). Regulation of organ growth by morphogen gradients. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a001669.

**Schwank, G., Restrepo, S. and Basler, K.** (2008). Growth regulation by Dpp: an essential role for Brinker and a non-essential role for graded signaling levels. *Development* **135**, 4003-13.

**Shea, M. J., King, D. L., Conboy, M. J., Mariani, B. D. and Kafatos, F. C.** (1990). Proteins that bind to *Drosophila* chorion cis-regulatory elements: a new C2H2 zinc finger protein and a C2C2 steroid receptor-like component. *Genes Dev* **4**, 1128-40.

**Shen, J. and Dahmann, C.** (2005). Extrusion of cells with inappropriate Dpp signaling from *Drosophila* wing disc epithelia. *Science* **307**, 1789-90.

**Shen, J., Dahmann, C. and Pflugfelder, G. O.** (2010). Spatial discontinuity of optomotor-blind expression in the *Drosophila* wing imaginal disc disrupts epithelial architecture and promotes cell sorting. *BMC Dev Biol* **10**, 23.

**Shen, J., Dorner, C., Bahlo, A. and Pflugfelder, G. O.** (2008). optomotor-blind suppresses instability at the A/P compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Mech Dev* **125**, 233-46.

**Shilo, B. Z.** (2003). Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res* **284**, 140-9.

**Simcox, A. A., Grumblin, G., Schnepf, B., Bennington-Mathias, C., Hersperger, E. and Shearn, A.** (1996). Molecular, phenotypic, and expression analysis of vein, a gene required for growth of the *Drosophila* wing disc. *Dev Biol* **177**, 475-89.

**Sivasankaran, R., Vigano, M. A., Muller, B., Affolter, M. and Basler, K.** (2000). Direct transcriptional control of the Dpp target omb by the DNA binding protein Brinker. *EMBO J* **19**, 6162-72.

**Staebling-Hampton, K. and Hoffmann, F. M.** (1994). Ectopic decapentaplegic in the *Drosophila* midgut alters the expression of five homeotic genes, dpp, and wingless, causing specific morphological defects. *Dev Biol* **164**, 502-12.

**Stathopoulos, A. and Levine, M.** (2002). Whole-genome expression profiles identify gene batteries in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**, 464-5.

**Stronach, B. and Perrimon, N.** (2002). Activation of the JNK pathway during dorsal closure in *Drosophila* requires the mixed lineage kinase, slipper. *Genes Dev* **16**, 377-87.

**Struhl, G. and Basler, K.** (1993). Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**, 527-40.

**Sturtevant, M. A., Biehs, B., Marin, E. and Bier, E.** (1997). The spalt gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 21-32.

**Surka, W. S., Kohlhase, J., Neunert, C. E., Schneider, D. S. and Proud, V. K.** (2001). Unique family with Townes-Brocks syndrome, SALL1 mutation, and cardiac defects. *Am J Med Genet* **102**, 250-7.

**Sweetman, D. and Munsterberg, A.** (2006). The vertebrate spalt genes in development and disease. *Dev Biol* **293**, 285-93.

**Tabata, T. and Kornberg, T. B.** (1994). Hedgehog is a signaling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **76**, 89-102.

**Teleman, A. A. and Cohen, S. M.** (2000). Dpp gradient formation in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell* **103**, 971-80.

**Terriente Felix, J., Magarinos, M. and Diaz-Benjumea, F. J.** (2007). Nab controls the activity of the zinc-finger transcription factors Squeeze and Rotund in *Drosophila* development. *Development* **134**, 1845-52.

**Towers, M. and Tickle, C.** (2009). Generation of pattern and form in the developing limb. *Int J Dev Biol* **53**, 805-12.

**Vervoort, M., Crozatier, M., Valle, D. and Vincent, A.** (1999). The COE transcription factor Collier is a mediator of short-range Hedgehog-induced patterning of the *Drosophila* wing. *Curr Biol* **9**, 632-9.

**Wang, S. H., Simcox, A. and Campbell, G.** (2000). Dual role for *Drosophila* epidermal growth factor receptor signaling in early wing disc development. *Genes Dev* **14**, 2271-6.

**White, K. P., Rifkin, S. A., Hurban, P. and Hogness, D. S.** (1999). Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. *Science* **286**, 2179-84.

**Williams, J. A., Paddock, S. W. and Carroll, S. B.** (1993). Pattern formation in a secondary field: a hierarchy of regulatory genes subdivides the developing *Drosophila* wing disc into discrete subregions. *Development* **117**, 571-84.

**Williams, J. A., Paddock, S. W., Vorwerk, K. and Carroll, S. B.** (1994). Organization of wing formation and induction of a wing-patterning gene at the dorsal/ventral compartment boundary. *Nature* **368**, 299-305.

**Wong, C. C., Gaspar-Maia, A., Ramalho-Santos, M. and Reijo Pera, R. A.** (2008). High-efficiency stem cell fusion-mediated assay reveals Sall4 as an enhancer of reprogramming. *PLoS One* **3**, e1955.

**Wu, Q., Chen, X., Zhang, J., Loh, Y. H., Low, T. Y., Zhang, W., Sze, S. K., Lim, B. and Ng, H. H.** (2006). Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells. *J Biol Chem* **281**, 24090-4.

**Yamashita, K., Sato, A., Asashima, M., Wang, P. C. and Nishinakamura, R.** (2007). Mouse homolog of SALL1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, binds to A/T-rich sequences in pericentric heterochromatin via its C-terminal zinc finger domains. *Genes Cells* **12**, 171-82.

**Yang, J., Chai, L., Liu, F., Fink, L. M., Lin, P., Silberstein, L. E., Amin, H. M., Ward, D. C. and Ma, Y.** (2007). Bmi-1 is a target gene for SALL4 in hematopoietic and leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10494-9.

**Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the Drosophila wing. *Development* **121**, 2265-78.

**Zecca, M., Basler, K. and Struhl, G.** (1996). Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell* **87**, 833-44.

**Zecca, M. and Struhl, G.** (2002). Control of growth and patterning of the Drosophila wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* **129**, 1369-76.

**Zeitlinger, J. and Bohmann, D.** (1999). Thorax closure in Drosophila: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development* **126**, 3947-56.

**Zhang, J., Tam, W. L., Tong, G. Q., Wu, Q., Chan, H. Y., Soh, B. S., Lou, Y., Yang, J., Ma, Y., Chai, L. et al.** (2006). Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. *Nat Cell Biol* **8**, 1114-23.

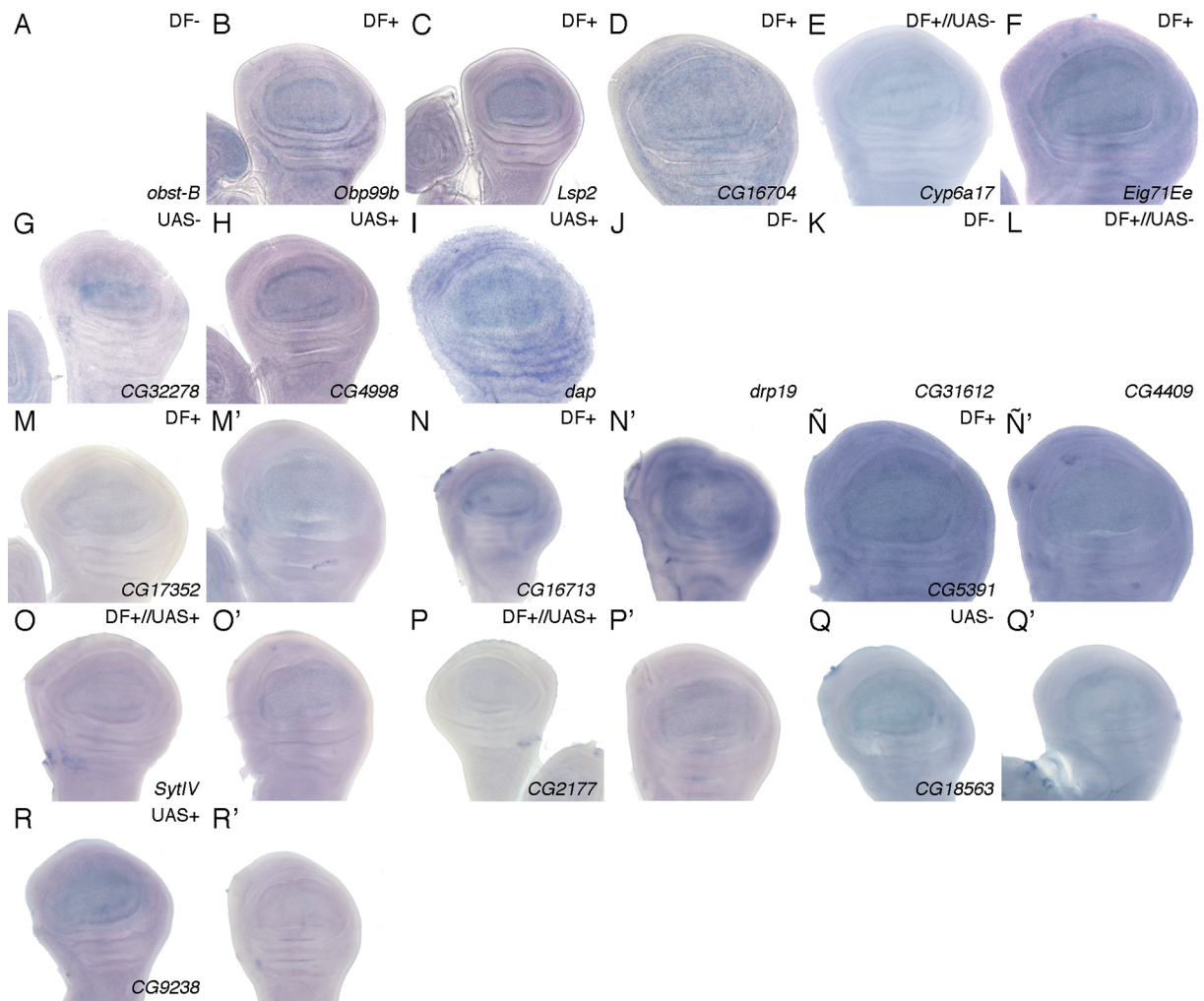




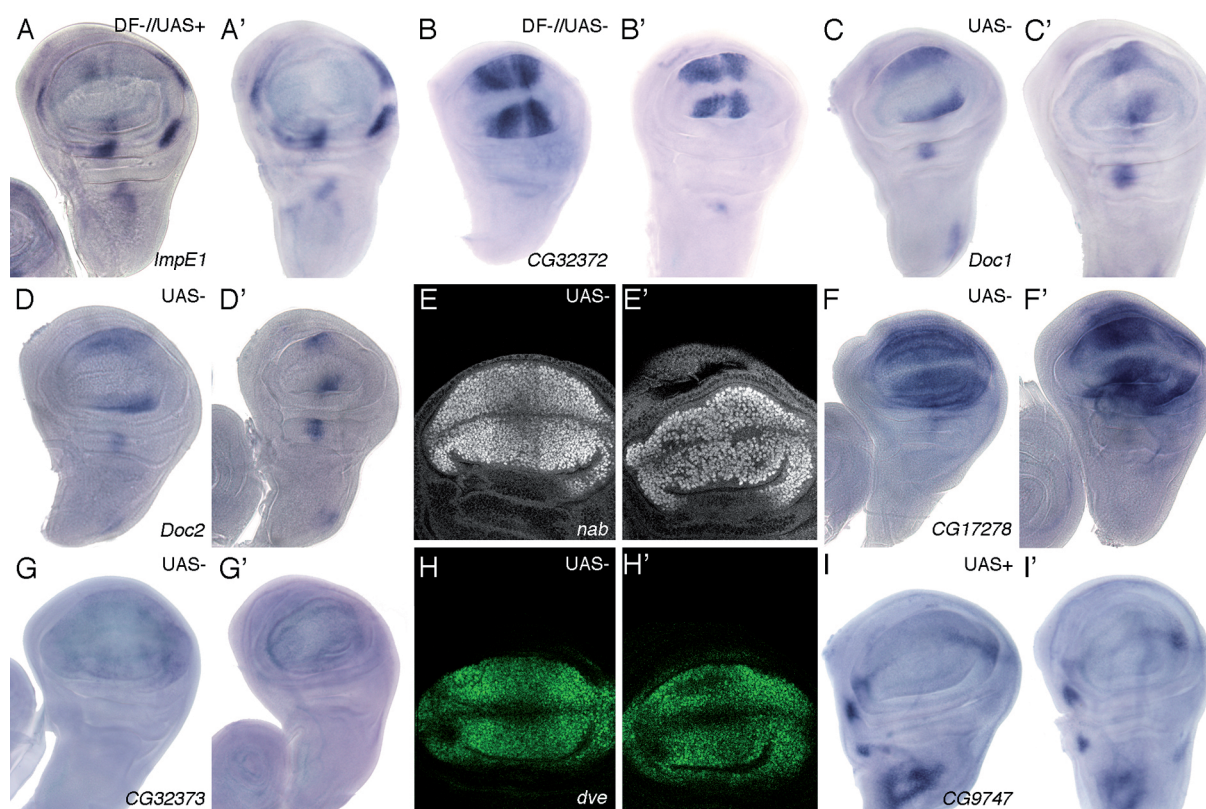
## Anexo I







**Figura Suplementaria 1. Genes que no presentan expresión en discos imaginales de ala (N o N=).** (A-R) Hibridación *in situ* en discos imaginales de ala de larva III de genotipo silvestre (A-R) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>IEPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (M'-R'). Arriba y a la derecha de cada panel se indica el microarray donde se identificó cada gen. Abajo y a la derecha se indica el nombre del gen del cual se muestran el patrón de expresión.

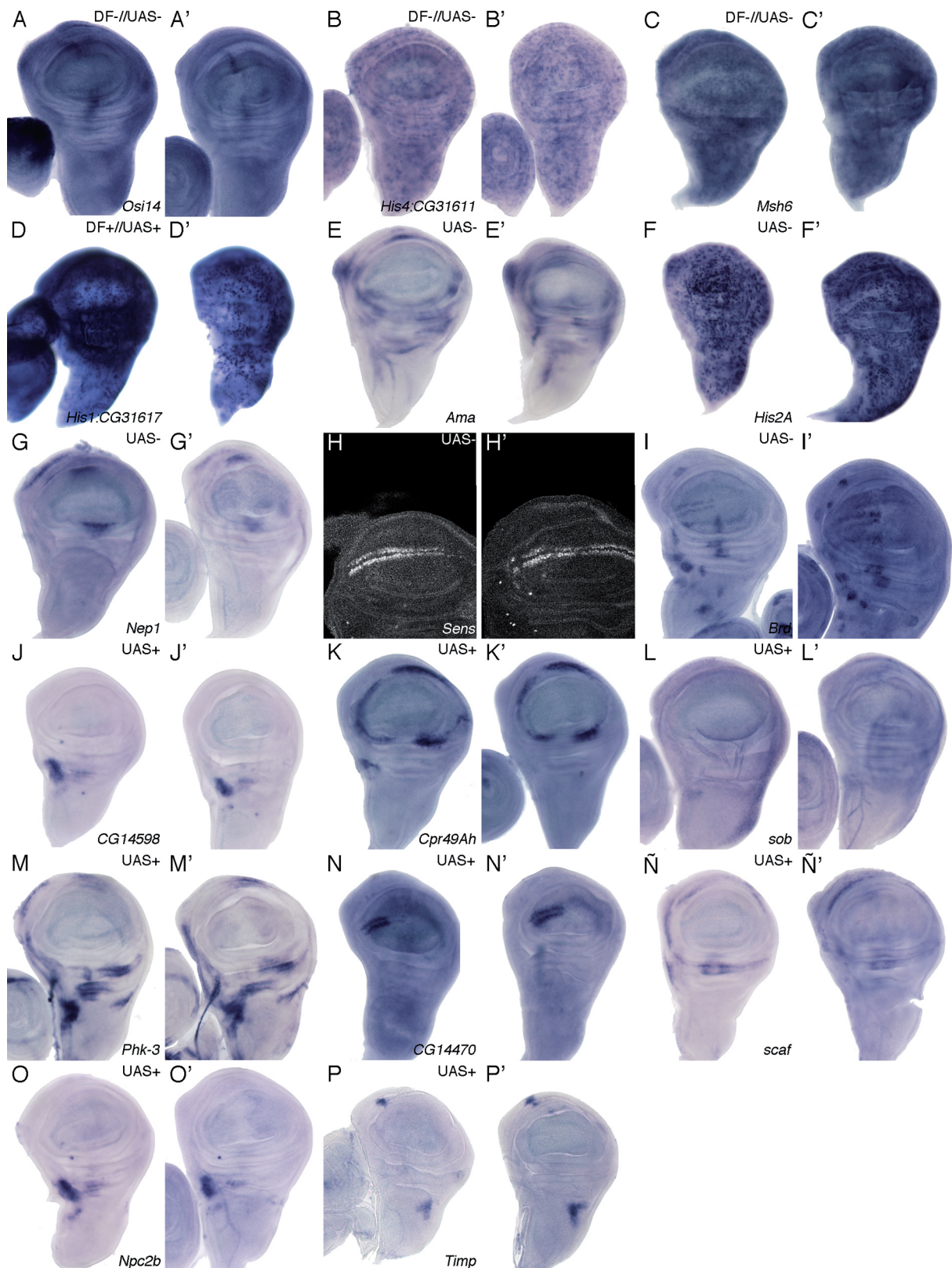


**Figura Suplementaria 2. Patrones de expresión restringidos a la región central del ala en discos imaginales de ala (SS=) que no presentan variaciones en discos imaginales mutantes para *salm/salr*.** (A-I) Hibridación *in situ* en discos imaginales de ala de larva III de genotipo silvestre (A-I) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/ UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (A'-I'). Arriba y a la derecha de cada pareja de discos se muestra el microarray dónde se identificó cada gen. Abajo y a la derecha se indica el nombre del gen del cual se muestra el patrón de expresión.

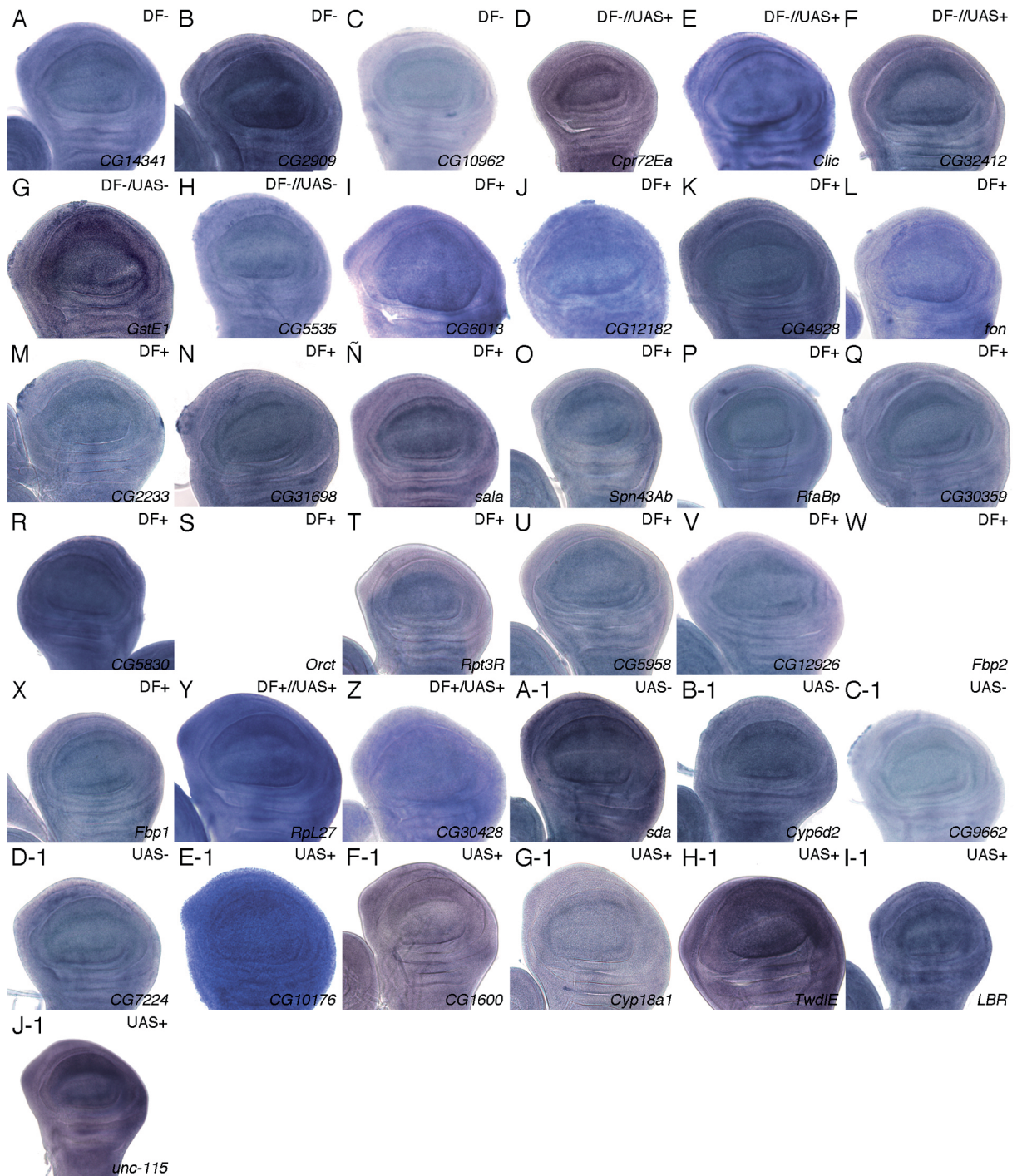


**Figura Suplementaria 3. Patrones de expresión restringidos a una región concreta del disco imaginal de ala (S), mostrando, en algunos casos, variaciones en discos imaginales mutantes para *salm/salr* (S-).** (A-C-1) Hibridación *in situ* en discos imaginales de ala de larva III de genotipo silvestre (A-C-1) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (A'-W'). Arriba y a la derecha de cada panel se indica el microarray dónde se identificó cada gen. Abajo y a la derecha se indica el nombre del gen del cual se muestra el patrón de expresión.



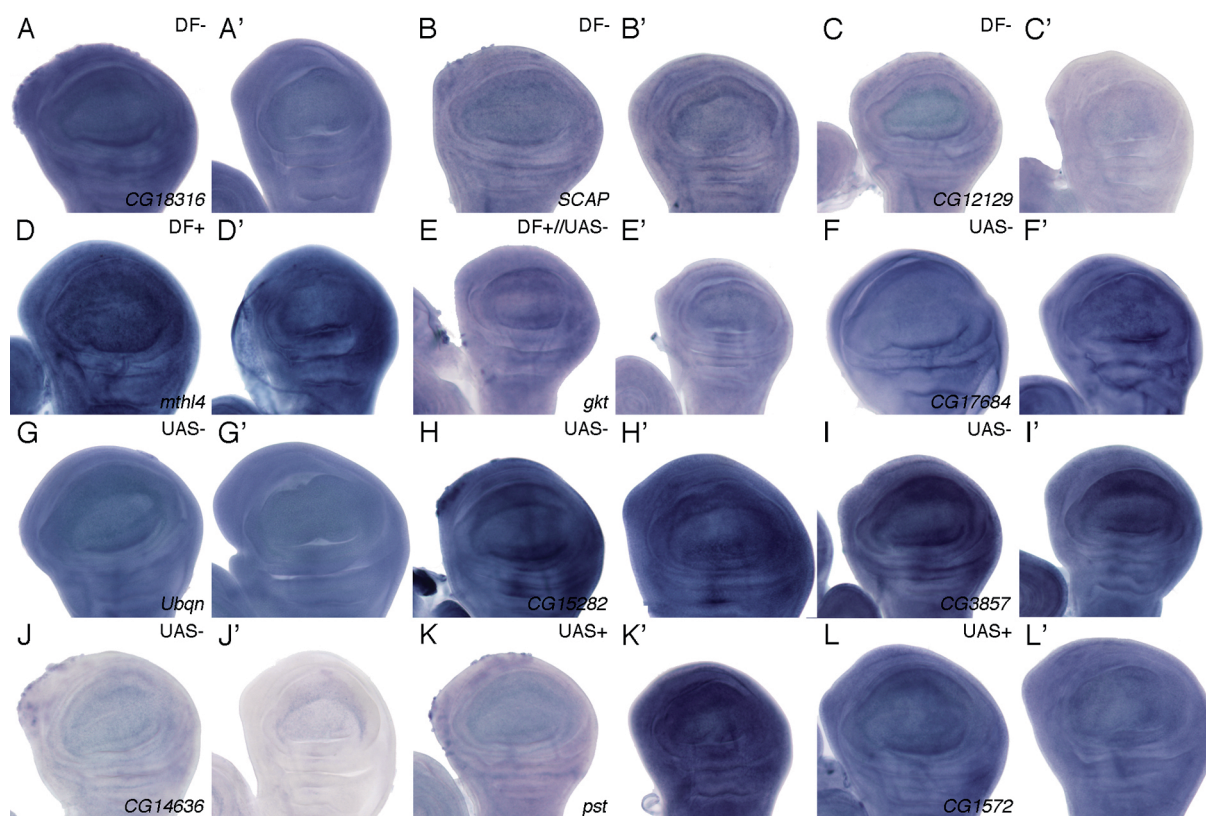


**Figura Suplementaria 4. Patrones de expresión restringidos a una región concreta del disco imaginal de ala que no muestran variaciones en su expresión en discos imaginales mutantes para *salm/salr* (S=).** (A-P) Hibridación *in situ* en discos imaginales de ala de larva III de genotipo silvestre (A-P) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+* (A'-P'). Arriba y a la derecha de cada pareja de discos se muestra el microarray dónde se identificó cada gen. Abajo y a la derecha se indica el nombre del gen del cual se muestra el patrón de expresión.

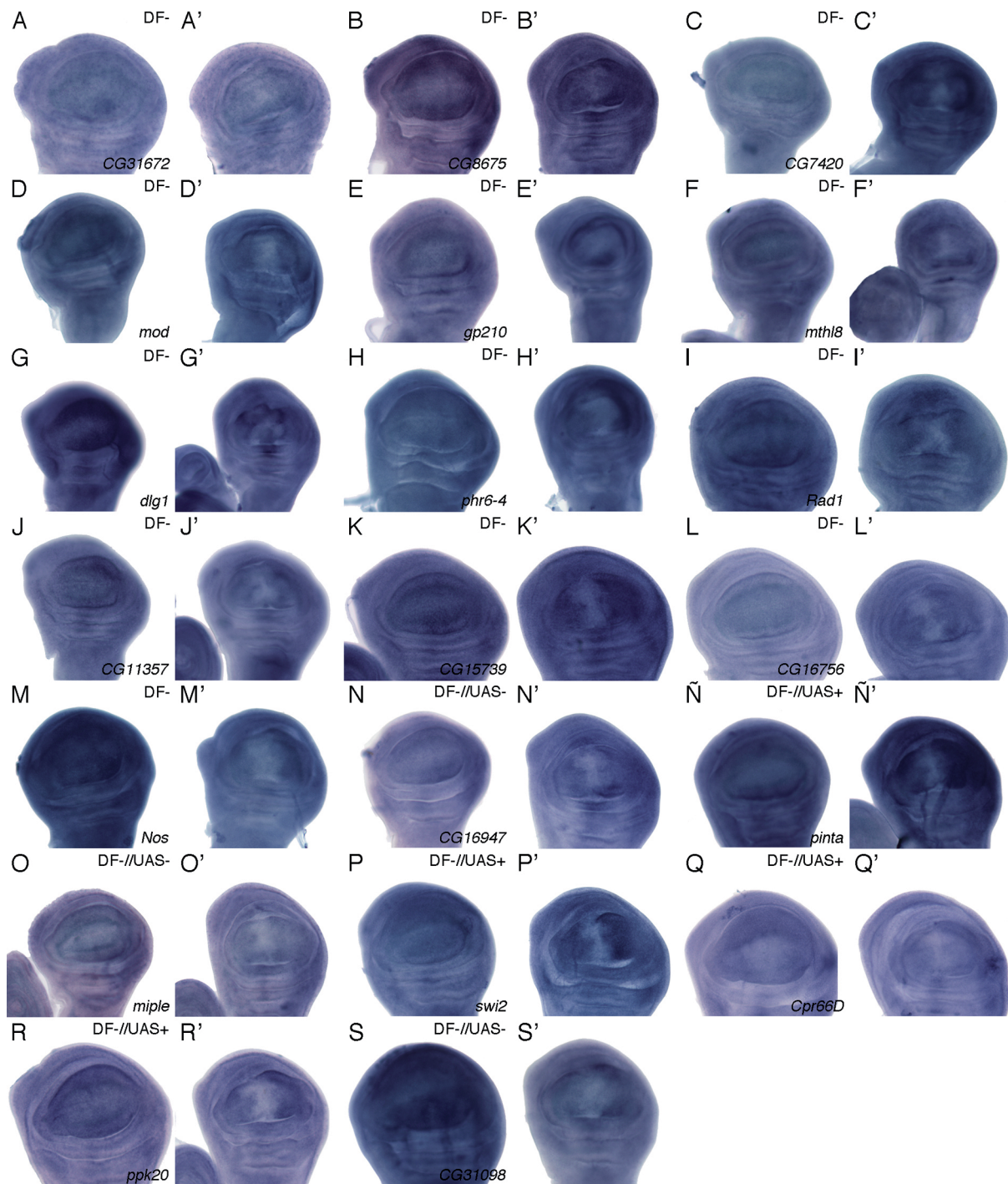


**Figura Suplementaria 5. Genes que muestran un patrón de expresión ubicuo en discos imaginales de ala (U).**  
 (A-J-1) Hibridación *in situ* en discos imaginales de ala de larva III mostrando el patrón de expresión de sondas anti-sentido (AS) en moscas de genotipo silvestre. Arriba y a la derecha de cada imagen se muestra el microarray dónde se identificó cada gen. Abajo y a la derecha se indica el nombre del gen del cual se muestra el patrón de expresión.



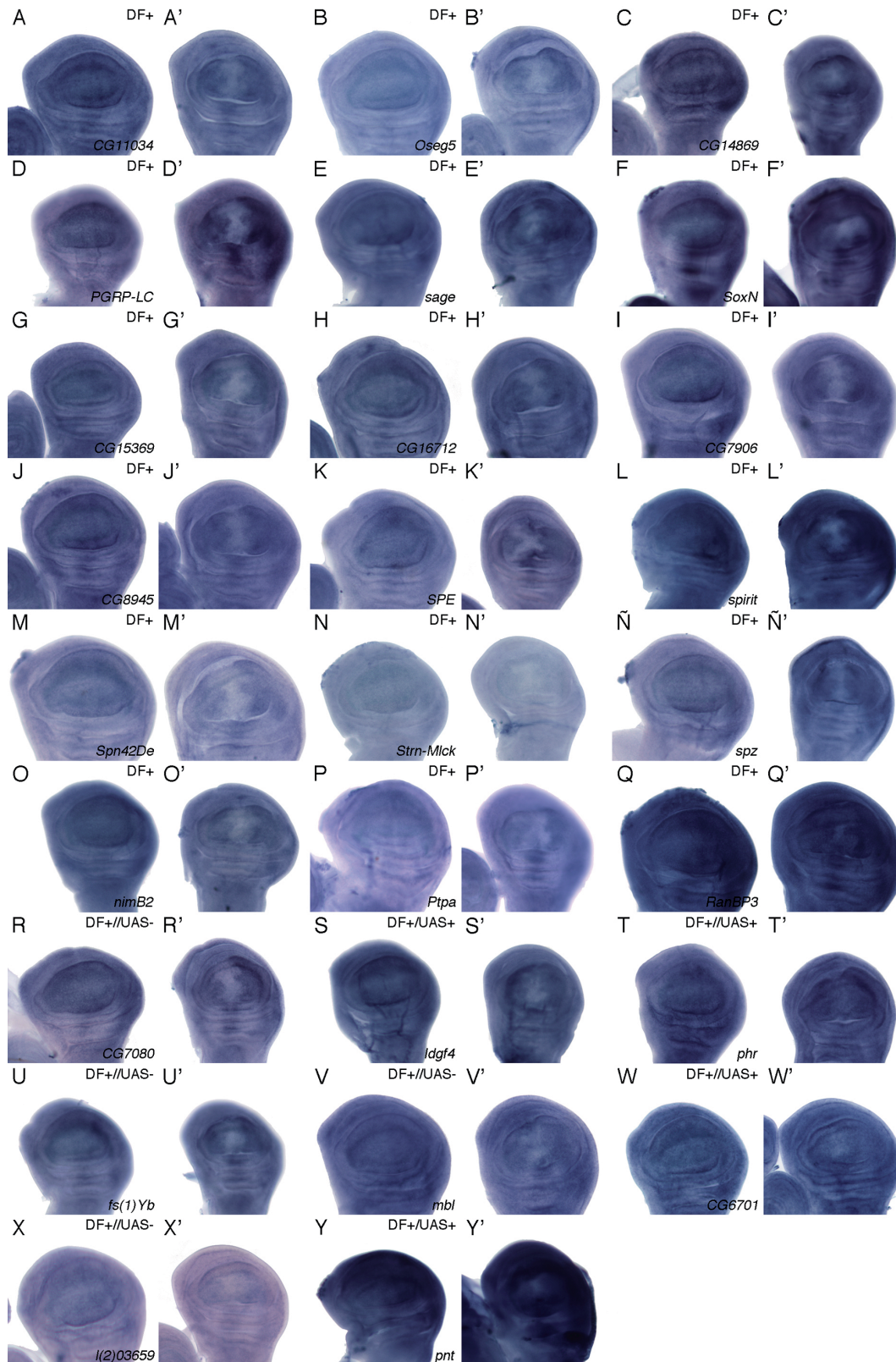


**Figura Suplementaria 6. Genes que muestran un patrón de expresión ubicuo en discos imaginales de ala, y que no presentan variaciones en su expresión en discos imaginales mutantes para *salm/salr* (U=).** (A-L) Hibridación *in situ* en discos imaginales de ala de larva III de genotipo silvestre (A-L) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+* (A'-L'). Arriba y a la derecha de cada pareja de discos se muestra el microarray dónde se identificó cada gen. Abajo y a la derecha se indica el nombre del gen del cual se muestra el patrón de expresión.

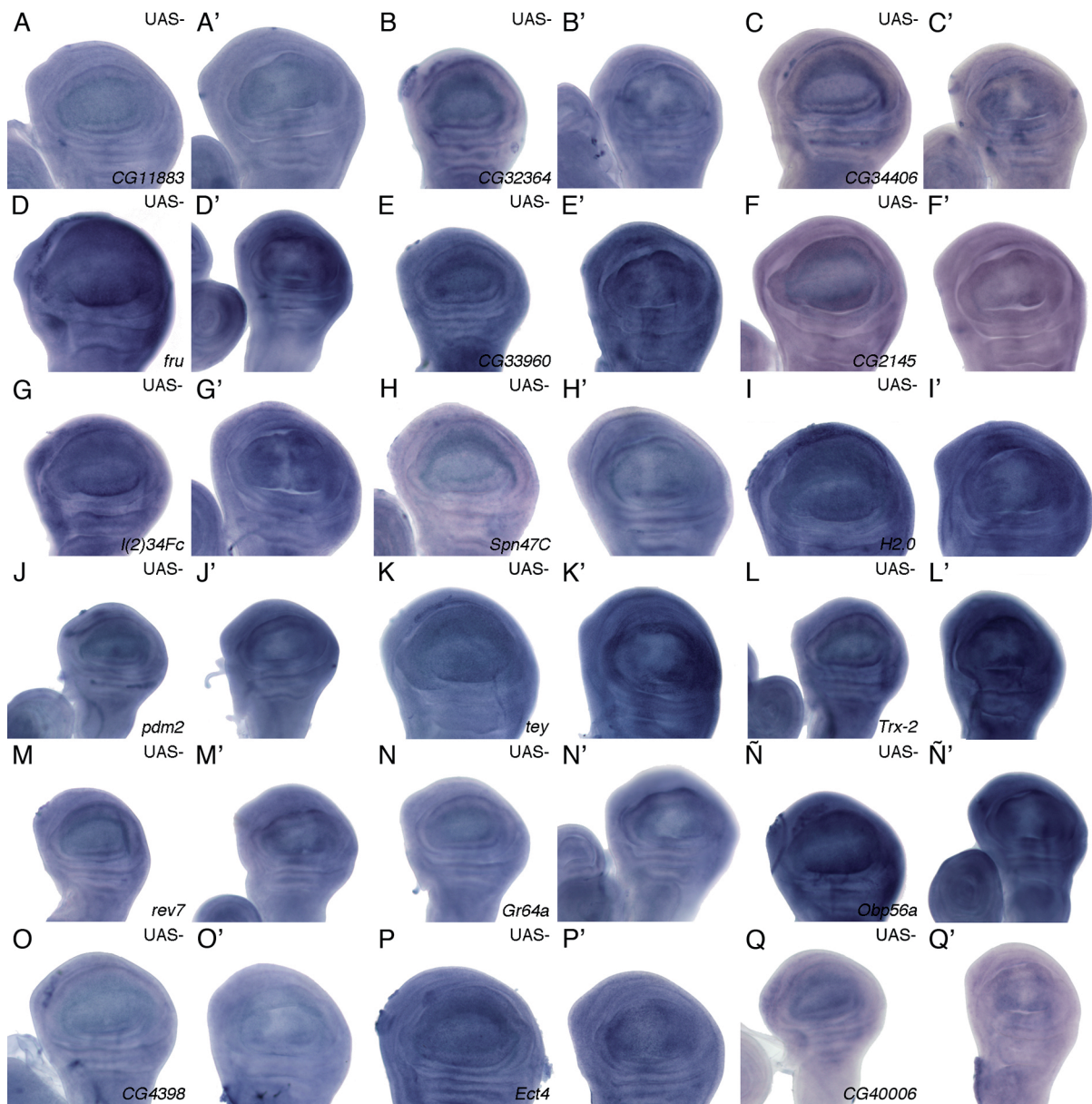


**Figura Suplementaria 7. Patrones de expresión ubicuos en discos imaginales de ala de genes que presentan variaciones en su expresión en discos imaginales mutantes para *salm/salr* (U-) en la condición de microarray DF-.** (A-S) Hibridación *in situ* en discos imaginales de ala de larva III de genotipo silvestre (A-S) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (A'-S'). Arriba y a la derecha de cada pareja de discos se muestra el microarray dónde se identificó cada gen. Abajo y a la derecha se indica el nombre del gen del cual se muestra el patrón de expresión.



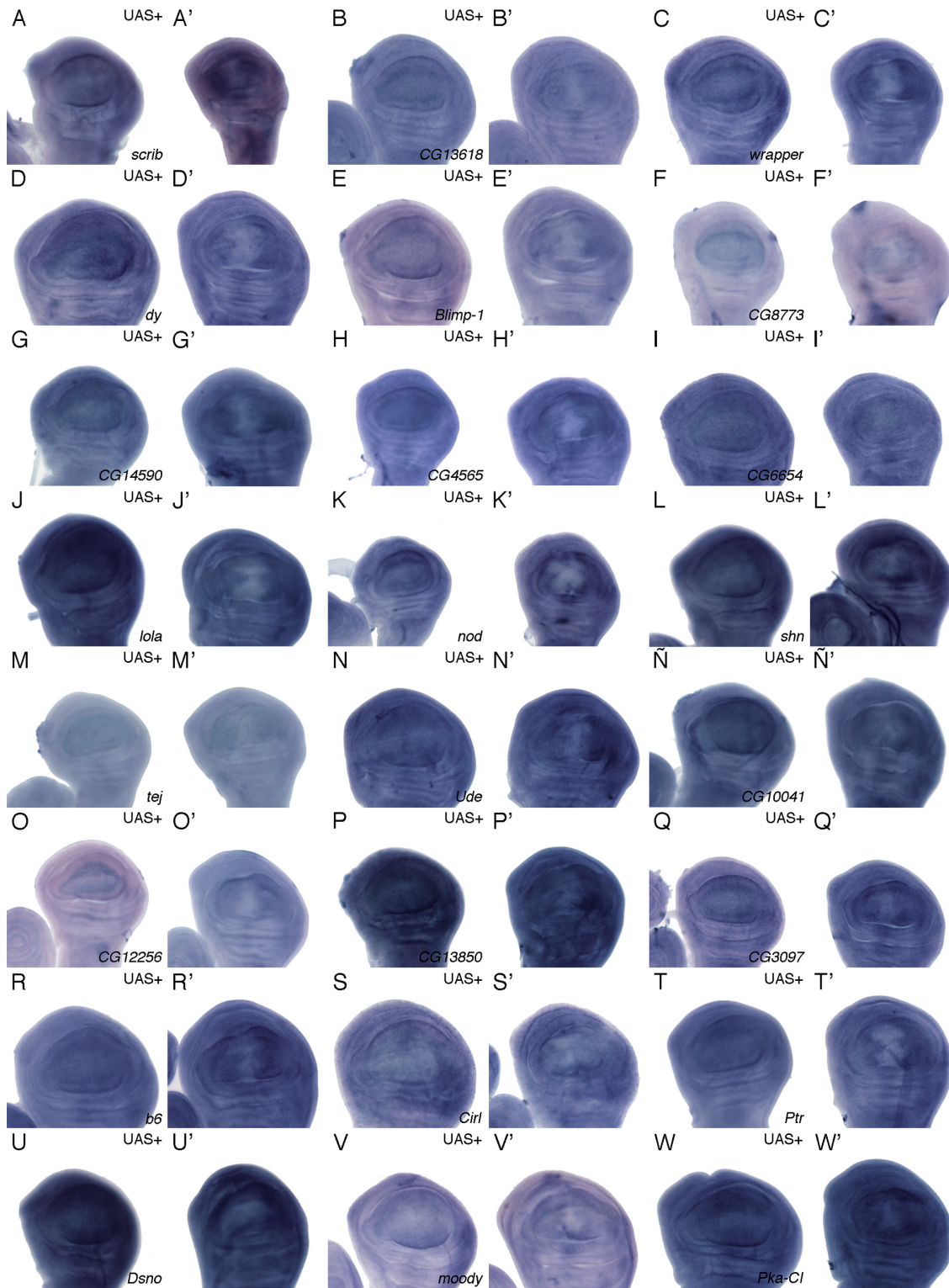


**Figura Suplementaria 8. Patrones de expresión ubicuos en discos imaginales de ala de genes que presentan variaciones en su expresión en discos imaginales mutantes para *salmon/salmon* (U-) en la condición de microarray DF+.** (A-Y) Hibridación *in situ* en discos imaginales de ala de larva III de genotipo silvestre (A-Y) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salmon-i; UAS-salmon-i/+* (A'-Y'). Arriba y a la derecha de cada pareja de discos se muestra el microarray dónde se identificó cada gen. Abajo y a la derecha se indica el nombre del gen del cual se muestra el patrón de expresión.



**Figura Suplementaria 9. Patrones de expresión ubicuos en discos imaginales de ala de genes que presentan variaciones en su expresión en discos imaginales mutantes para *salm/salr* (U-) en la condición de microarray UAS-. (A-Q) Hibridación *in situ* en discos imaginales de ala de larva III de genotipo silvestre (A-Q) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/UAS-salm-i;UAS-salr-i/+* (A'-Q'). Arriba y a la derecha de cada pareja de discos se muestra el microarray dónde se identificó cada gen. Abajo y a la derecha se indica el nombre del gen del cual se muestra el patrón de expresión.**





**Figura Suplementaria 10. Patrones de expresión ubicuos en discos imaginales de ala de genes que presentan variaciones en su expresión en discos imaginales mutantes para *salm/salr* (U-) en la condición de microarray UAS+.** (A-W) Hibridación *in situ* en discos imaginales de ala de larva III mostrando el patrón de expresión de sondas anti-sentido (AS) en moscas de genotipo silvestre (A-W) y de genotipo *UAS-dicer/+; sal<sup>EPV</sup>-Gal4 UAS-GFP/ UAS-salm-i; UAS-salr-i/+* (A'-W'). Arriba y a la derecha de cada pareja de discos se muestra el microarray dónde se identificó cada gen. Abajo y a la derecha se indica el nombre del gen del cual se muestra el patrón de expresión.

TABLA SUPLEMENTARIA 1

ID-NIG-FLY	Gen	ID-NIG-FLY	Gen
10120R-3	<i>CG10120</i>	13941R-1	<i>CG13941</i>
10160R-1	<i>CG10160</i>	14121R-1	<i>CG14121</i>
10311R-7	<i>CG10311</i>	14224R-1	<i>CG14224</i>
10382R-3	<i>CG10382</i>	14470R-1	<i>CG14470</i>
10559R-1	<i>CG10559</i>	14598R-3	<i>CG14598</i>
10645R-1	<i>CG10645</i>	14629R-2	<i>CG14629</i>
10681R-2	<i>CG10681</i>	14636R-3	<i>CG14636</i>
7090R-2	<i>CG10962</i>	14695R-1	<i>CG14695</i>
10997R-1	<i>CG10997</i>	15000R-1	<i>CG15000</i>
11066R-1	<i>CG11066</i>	15009R-3	<i>CG15009</i>
11212R-2	<i>CG11212</i>	15046R-1	<i>CG15046</i>
11295R-1	<i>CG11295</i>	1512R-3	<i>CG1512</i>
11312R-1	<i>CG11312</i>	15173R-1	<i>CG15173</i>
1133R-3	<i>CG1133</i>	15236R-1	<i>CG15236</i>
11527R-1	<i>CG11527</i>	15571R-1	<i>CG15571</i>
1155R-4	<i>CG1155</i>	15628R-4	<i>CG15628</i>
11550R-2	<i>CG11550</i>	15745R-2	<i>CG15745</i>
11897R-2	<i>CG11897</i>	15784R-3	<i>CG15784</i>
12129R-1	<i>CG12129</i>	16733R-1	<i>CG16733</i>
12172R-2	<i>CG12172</i>	16885R-1	<i>CG16885</i>
12182R-1	<i>CG12182</i>	17018R-1	<i>CG17018</i>
1221R-1	<i>CG1221</i>	17036R-1	<i>CG17036</i>
12256R-2	<i>CG12256</i>	17104R-3	<i>CG17104</i>
1273R-3	<i>CG1273</i>	1718R-3	<i>CG1718</i>
12833R-3	<i>CG12833</i>	17285R-6	<i>CG17285</i>
12868R-4	<i>CG12868</i>	17352R-3	<i>CG17352</i>
13140R-1	<i>CG13140</i>	17530R-1	<i>CG17430</i>
13258R-1	<i>CG13258</i>	1780R-4	<i>CG1780</i>
1342R-1	<i>CG1342</i>	17838R-3	<i>CG17838</i>
13829R-2	<i>CG13829</i>	17914R-3	<i>CG17914</i>
13848R-4	<i>CG13848</i>	18213R-2	<i>CG18213</i>

TABLA SUPLEMENTARIA 1 (Continuación)

ID-NIG-FLY	Gen	ID-NIG-FLY	Gen
18316R-1	CG18316	32372R-2	CG32372
18349R-2	CG18349	32373R-1	CG32373
18405R-3	CG18405	3242R-1	CG3242
18410R-2	CG18410	3244R-1	CG3244
18455R-2	CG18455	3783R-2	CG32809
18578R-1	CG18578	7215R-1	CG32920
18600R-1	CG18600	3484R-2	CG32954
CG1869	1869R-3	6152R-3	CG33156
18657R-2	CG18657	32049R-1	CG33205
3364R-2	CG18817	7867R-2	CG33991
2233R-3	CG2233	1630R-1	CG34359
2488R-3	CG2488	3541R-1	CG3541
2617R-3	CG2617	3625R-1	CG3625
30196R-3	CG30196	3649R-1	CG3649
30217R-1	CG30217	3656R-3	CG3656
31098R-2	CG31098	3752R-1	CG3752
31176R-1	CG31176	3837R-1	CG3837
31332R-2	CG31332	3857R-2	CG3857
3153R-3	CG3153	3896R-2	CG3896
31559R-1	CG31559	3902R-1	CG3902
31607R-1	CG31607	4178R-3	CG4178
10611R-1	CG31692	4180R-1	CG4180
31961R-3	CG31961	4182R-1	CG4182
31997R-2	CG31997	4190R-2	CG4190
32107R-1	CG32107	7462R-2	CG42734
32120R-1	CG32120	4322R-1	CG4322
10745R-2	CG32130	4398R-1	CG4398
32137R-2	CG32137	4409R-2	CG4409
32242R-1	CG32242	4432R-1	CG4432
12032R-4	CG32281	4511R-1	CG4511
32356R-3	CG32356	4698R-3	CG4698

TABLA SUPLEMENTARIA 1 (Continuación)

ID-NIG-FLY	Gen	ID-NIG-FLY	Gen
4759R-3	CG4759	7720R-1	CG7720
4818R-3	CG4818	7900R-1	CG7900
4998R-2	CG4998	7978R-3	CG7978
4869R-2	CG4869	8095R-2	CG8095
4928R-3	CG4928	8360R-6	CG8360
5187R-1	CG5187	8451R-3	CG8451
5247R-2	CG5247	8453R-1	CG8453
5249R-2	CG5249	8515R-1	CG8515
5345R-2	CG5345	8588R-1	CG8588
5431R-4	CG5431	8654R-1	CG8654
5758R-2	CG5758	8675R-1	CG8675
5894R-1	CG5905	8768R-2	CG8768
5993R-1	CG5993	8817R-1	CG8817
6013R-2	CG6013	8826R-2	CG8826
6043R-2	CG6043	8827R-1	CG8827
6131R-2	CG6131	8965R-3	CG8965
6131R-2	CG6131	9027R-4	CG9027
6186R-2	CG6186	9238R-2	CG9238
6357R-1	CG6357	9355R-1	CG9355
6701R-1	CG6701	9358R-2	CG9358
7003R-2	CG7003	9441R-1	CG9441
7138R-2	CG7138	9460R-3	CG9460
7160R-3	CG7160	9689R-3	CG9689
7173R-1	CG7173	9747R-1	CG9747
7221R-7	CG7221	9766R-2	CG9766
7525R-2	CG7525	9771R-3	CG9771
7532R-1	CG7532	9792R-1	CG9792
7539R-1	CG7539		
7565R-1	CG7565		
7584R-3	CG7584		
7587R-1	CG7587		

**Tabla Suplementaria 1. Líneas *UAS-ARN* interferente de NIG-FLY (National Institute of Genetics, Japón).** Se muestra la referencia correspondiente a NIG-FLY y el gen al que corresponde.



TABLA SUPLEMENTARIA 2

ID-VDRC	GEN	ID-VDRC	GEN
102405	CG10016	31945	CG12481
110063	CG10041	48130	CG12505
33317	CG10047	109054	CG12519
43454	CG10176	108484	CG12699
104432	CG10225	49124	CG12740
13466	CG10363	8717	CG12841
22752	CG10460	38712	CG12854
105871	CG10501	109580	CG12926
107547	CG10855	45186	CG13004
103433	CG10863	16460	CG13023
40833	CG11007	104331	CG1303
37941	CG11034	104331	CG1303
100944	CG11064	9227	CG13053
37199	CG11175	48760	CG13062
35497	CG11205	102782	CG13063
105927	CG11261	47876	CG13064
108467	CG11357	23862	CG13277
2710	CG11370	108838	CG1344
5622	CG11390	42241	CG13521
38041	CG1152	14714	CG13618
102979	CG1155	42326	CG13648
15876	CG11607	52582	CG13737
109152	CG11765	100863	CG13850
100850	CG11797	3464	CG13941
38590	CG11883	40899	CG14082
109041	CG11905	47583	CG14120
3335	CG11956	110243	CG14121
6498	CG12116	105005	CG14307
109708	CG12182	8032	CG14326
102126	CG12287	41164	CG14332
14185	CG12310	107525	CG14341

TABLA SUPLEMENTARIA 2 (Continuación)

ID-VDRC	GEN	ID-VDRC	GEN
24867	CG14534	39882	CG16926
41248	CG14567	105309	CG16987
41536	CG14590	108103	CG16947
102989	CG14640	101947	CG1698
110157	CG14869	102469	CG17041
102201	CG14935	6838	CG17244
42880	CG15006	106420	CG17270
106073	CG15080	44347	CG17278
108570	CG15117	100646	CG17352
107213	CG15151	101844	CG17364
44952	CG15212	50090	CG17530
7712	CG15282	48150	CG1763
106111	CG15369	103199	CG17684
23313	CG15404	35632	CG17698
39997	CG15544	32991	CG17726
107732	CG15571	8614	CG18087
103221	CG15645	107029	CG18250
109915	CG15671	101122	CG18343
109915	CG15671	52337	CG18349
23220	CG1572	102124	CG1835
104787	CG15736	33133	CG1851
106016	CG15739	100330	CG18522
106643	CG15896	100490	CG18547
108325	CG1600	104264	CG18563
45188	CG16700	45315	CG1865
12995	CG16704	102736	CG1873
30972	CG16705	39224	CG18812
109238	CG16712	50099	CG18853
105067	CG16713	103755	CG1925
102908	CG16756	101340	CG1938
51362	CG16884	107936	CG2056

TABLA SUPLEMENTARIA 2 (Continuación)

ID-VDRC	GEN	ID-VDRC	GEN
49044	CG2060	21388	CG31672
14874	CG2145	13022	CG31698
44038	CG2150	100767	CG31721
51083	CG2177	102534	CG31764
22944	CG2198	105925	CG31839
108958	CG2201	36297	CG31884
52353	CG2559	102286	CG32021
110056	CG2706	52276	CG32029
43622	CG2849	6335	CG32055
100165	CG2909	102854	CG32107
106153	CG2914	41327	CG32198
108813	CG2948	26045	CG32364
33609	CG2999	103313	CG32368
25550	CG3000	12676	CG3240
33662	CG30015	38277	CG32412
44785	CG30017	4071	CG32475
25562	CG30069	49720	CG32495
43732	CG3008	103216	CG32625
15514	CG30101	41913	CG3289
38848	CG30152	7317	CG33131
25604	CG30217	105486	CG33197
24774	CG30428	102077	CG33257
107929	CG3096	48457	CG33333
107929	CG3096	41918	CG3339
14526	CG3100	33090	CG33970
21312	CG31293	44536	CG3424
16779	CG3132	103140	CG3436
21344	CG31436	22612	CG34373
8551	CG31547	4783	CG6281
30545	CG31612	110077	CG34392
110118	CG31617	43767	CG34406

TABLA SUPLEMENTARIA 2 (Continuación)

ID-VDRC	GEN	ID-VDRC	GEN
18447	CG3568	7989	CG6016
41090	CG3726	23526	CG6132
33172	CG3763	101871	CG6272
9647	CG3851	52658	CG6331
44733	CG3857	8782	CG6357
9981	CG3979	100566	CG6378
108833	CG4016	102980	CG6416
44402	CG4073	27623	CG6433
51495	CG4163	3029	CG6464
6983	CG4183	27633	CG6470
104004	CG4210	50752	CG6536
12045	CG4319	105550	CG6654
101524	CG4379	104262	CG6658
34837	CG4409	109979	CG6806
40531	CG4533	104180	CG6816
21886	CG4586	38129	CG6821
28386	CG4881	49801	CG6835
16747	CG5133	109917	CG6983
40581	CG5164	108076	CG7003
108686	CG5171	104928	CG7080
103431	CG5187	101198	CG7201
49982	CG5202	106228	CG7219
22031	CG5217	43822	CG7367
14452	CG5391	30934	CG7447
103743	CG5486	38162	CG7465
22145	CG5518	101476	CG7470
107030	CG5535	12405	CG7532
106867	CG5730	36659	CG7577
109538	CG5799	6286	CG7592
33358	CG5835	30391	CG7620
20979	CG5958	106995	CG7642

TABLA SUPLEMENTARIA 2 (Continuación)

ID-VDRC	GEN
100328	CG7722
105643	CG7734
101724	CG8172
40704	CG8317
24113	CG8503
103264	CG8589
100749	CG8639
40803	CG8776
106065	CG8780
100105	CG8799
109757	CG8825
23650	CG8902
46925	CG8945
107828	CG9008
102483	CG9040
102269	CG9057
9696	CG9093
108351	CG9218
100020	CG9333
100020	CG9333
8036	CG9369
10064	CG9416
110309	CG9475
7278	CG9662
13341	CG9691
100926	CG9792
102880	CG9812
107199	CG9850
107199	CG9850
105944	CG9945

**Tabla Suplementaria 2. Líneas UAS-ARN interferente de VDRC (Vienna Drosophila RNAi Center, Viena).** Se muestra la referencia correspondiente a VDRC y el gen al que corresponde.

TABLA SUPLEMENTARIA 3

ID-BL	GEN	ID-BL	GEN
28759	CG10200	25954	CG12505
31487	CG10855	32962	CG12755
29421	CG15765	25980	CG12952
28768	CG15890	31876	CG1411
28023	CG17843	31593	CG14307
25810	CG18110	28530	CG14485
28520	CG18278	28626	CG1506
31736	CG3008	28353	CG15274
28321	CG30089	31936	CG17077
31554	CG32850	25780	CG1725
28932	CG33960	26299	CG17927
32332	CG4267	25996	CG18024
32893	CG4565	27732	CG18214
33359	CG5022	33416	CG2198
31746	CG5830	28980	CG2759
32510	CG7420	29548	CG2999
32843	CG7787	31590	CG30092
30519	CG7906	26221	CG3090
26228	CG10037	31620	CG3158
26738	CG1007	32995	CG32491
32899	CG10578	31566	CG33131
25847	CG1058	29585	CG33197
27030	CG10697	26252	CG3327
28310	CG10763	28612	CG3331
27676	CG11205	33379	CG33956
28973	CG11212	29317	CG34392
26204	CG11450	28338	CG34395
27272	CG11491	28032	CG3619
26714	CG12052	31733	CG4026
29392	CG12143	27306	CG40452
29543	CG12287	27045	CG42601

TABLA SUPLEMENTARIA 3 (Continuación)

ID-BL	GEN
29552	<i>CG42614</i>
31599	<i>CG4379</i>
33006	<i>CG4922</i>
26225	<i>CG5799</i>
29378	<i>CG6099</i>
28538	<i>CG6134</i>
28792	<i>CG6713</i>
29540	<i>CG7399</i>
25897	<i>CG7577</i>
27515	<i>CG8084</i>
27545	<i>CG8095</i>
26238	<i>CG8246</i>
27524	<i>CG8639</i>
32381	<i>CG8805</i>

**Tabla Suplementaria 3. Líneas *UAS-ARN* interferente de BL (Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University).** Se muestra la referencia correspondiente a BL y el gen al que corresponde.



TABLA SUPLEMENTARIA 4

EST-BDGP	Gen	EST-BDGP	Gen
RE67111	CG10047	RE15191	CG15282
RE28509	CG10176	IP05946	CG15369
GH10635	CG10241	LD04844	CG1572
LP06209	CG10460	LH01053	CG15825
SD06635	CG10962	GH18014	CG1600
LD46306	CG10997	RH31195	CG16704
GH18004	CG11064	GH28857	CG16705
GH05918	CG11066	RH38008	CG16712
RE13370	CG11370	LH02234	CG16884
LD24139	CG1155	RH04334	CG16885
RE37758	CG11607	GH14433	CG16987
LD21545	CG12129	RE34808	CG17018
LP08647	CG12172	SD04019	CG17278
GH02340	CG12182	LP01806	CG17285
RH10518	CG1221	GH07792	CG17352
LD41905	CG12505	SD27140	CG17684
RE03558	CG1273	LP07247	CG1772
RE73081	CG12833	LD38760	CG17952
RE39480	CG12926	LD11102	CG18213
LP09705	CG13140	GH26082	CG18316
LP03106	CG1342	LD05472	CG18455
RE08075	CG13618	LD37006	CG18522
LD38919	CG14224	LP35296	CG1865
GH19932	CG14307	LD45559	CG1869
RE55753	CG14341	GH10845	CG2145
RE71854	CG14534	RE66826	CG2177
RE40156	CG14598	LD39923	CG2198
RE60719	CG14636	GH20802	CG2233
SD07266	CG15009	LD21679	CG2849
LD36177	CG1512	RE54994	CG2909
RE28658	CG15212	LP06813	CG30069

TABLA SUPLEMENTARIA 4 (Continuación)

EST-BDGP	Gen	EST-BDGP	Gen
RE33807	CG3008	RE48009	CG3851
GH18222	CG30359	GH24078	CG3857
SD21514	CG30428	RE68569	CG40006
RE43153	CG3097	LP06948	CG42601
SD03267	CG31332	RE06985	CG4322
RE36503	CG3153	RE31155	CG4373
RE19601	CG31612	GH10009	CG4409
LD22825	CG31672	RE26454	CG4698
LP02725	CG31698	AT27980	CG4759
GH07269	CG31705	GH02976	CG4778
RE22018	CG31721	LP05492	CG4818
GH02216	CG31764	LP10436	CG4869
SD03042	CG31884	RE40068	CG4922
SD15619	CG32021	GH20759	CG4928
RE57183	CG32029	RE07247	CG4998
RE72629	CG32242	RE59988	CG5133
GH26392	CG32278	GH14654	CG5164
RE39082	CG32356	RE40937	CG5187
RE09158	CG32372	SD02661	CG5202
RE64043	CG32373	RE28533	CG5247
GH11174	CG32412	LP04851	CG5391
RE22261	CG3242	AT30002	CG5518
RH18728	CG3244	GH08303	CG5535
LP02895	CG32475	RE03646	CG5799
RE41137	CG32850	RE52350	CG5830
SD23366	CG33131	GH03315	CG5905
RE67734	CG33197	RE26342	CG5958
RE55923	CG33205	GH10002	CG6013
GH14066	CG33970	GH10915	CG6272
GH12163	CG3541	GH26186	CG6281
LP07806	CG3763	GH21655	CG6331

TABLA SUPLEMENTARIA 4 (Continuación)

EST-BDGP	Gen
LP08365	CG6357
GH09339	CG6654
LP03332	CG6806
RE70470	CG6816
GH18422	CG7224
RE60882	CG7532
LP06572	CG7592
LP03361	CG7604
GH18514	CG7722
GH07389	CG8084
LP12257	CG8095
LP12178	CG8172
RH62559	CG8317
IP07570	CG8515
GH28656	CG8588
GH07331	CG8639
LD08644	CG8675
GH27933	CG8825
RE56341	CG9238
LP04610	CG9355
RE09339	CG9358
AT28212	CG9475
AT03617	CG9662
GH07782	CG9747
LP02257	CG9850

**Tabla Suplementaria 4. ADNc de las colecciones de *Expression Sequence Tags (EST)* de BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project).** Se muestra el *EST* correspondiente de BDGP y el gen al que corresponde.

TABLA SUPLEMENTARIA 5

GEN	Oligonucleótido AS T7	Oligonucleótido S T3
<i>b6</i>	AAATTTTCATTGCCCACAAGC	TACAGACGCGTGGAAGATTG
<i>Blimp-1</i>	ACACATAGGGCCTGTCGTTC	TCCAATCTGGGACAGAATCC
<i>Brd</i>	TCTCTTAAACATAGATGGAAGACAATG	ATCACATTCAATCGCAACG
<i>CG10102</i>	TACTCCTCGTGCTGCTCCTC	CTCATCCGCGAACACTTCTC
<i>CG11034</i>	TAGCCACCATAGCTCCATCC	GCTGCATCTTCGGCTACTTC
<i>CG11357</i>	TCGACAGAGCATCAGATTGG	AAATCATCGCCGATTTTAGC
<i>CG11883</i>	AAGGGCAATGATGAGGTCAC	CAGGGAACCTCTGACGAGAC
<i>CG12256</i>	CAAACCTTTCCAAGGCACAG	CATGAACGGAGTAACTATTTTGTG
<i>CG14470</i>	GAAAGAGCGGTGTGAAAAGC	CAAGTCCCGAGTCTCTCAG
<i>CG15369</i>	AAGCATCGTGTTTCCTGACC	TGTTTCTCGCCAAGATTCTAA
<i>CG15739</i>	TCCGCATAGTAGTCCGGTATG	TCGACGTGGACTTCAATCTG
<i>CG15784</i>	AGCGCTGCTGTCTTTTCTTC	CACCAAAAGGACCAAGAAGC
<i>CG16705</i>	TCATGGCTCCAATTTCTGC	GTATGCTCCCAATTCCGTTG
<i>CG16712</i>	GAAATTCATTGCTGCCGTCT	CTTGCACTTTTGTTCGCAGA
<i>CG16756</i>	CGTTTCGGCAATATCGTTG	TGCTCTCGAATTGTGAGTGG
<i>CG16947</i>	GCTTGTAAGTGTGAGCGCATCC	CGCCGAATATCGCTAAATG
<i>CG30101</i>	ACAACGGTGTACGGCTTCTC	TGAAAGTGGATGTGCCTCAG
<i>CG30195</i>	GGTGTAAGTGTATTTGCGTCTG	GACGAACCGCAGATTGTG
<i>CG30196</i>	ATTCTCATTGGAACGCTTCG	CGAGAGTCTGGATGGCAGTG
<i>CG30217</i>	ATGGTAAGGAGTCGCTCCAG	GCCGTCAGCTAAAGTTCCAC
<i>CG3097</i>	CGAGAGCTGTGTCCTTGATG	GCGAGAACAAGAAGGTGTGG
<i>CG32364</i>	GAAACAGCCCTTTTGTCTGG	CGAGGAATCACAGTTGTTCTCC
<i>CG33960</i>	ACACCGGCGACTGTACTACC	AGGACGTTCTGTGATTTTTCG
<i>CG34406</i>	GATATAGCCGCGTTCTCGAC	TATGCCCACCATGTGTGAAG
<i>CG3726</i>	TGAATGGCTCTTCCCAGAAC	CAGCGTGCCTACTTGGAGAC
<i>CG42330</i>	GCATTATTGTGTGCCGTGAC	TAGGTCCCTTCGTGGAAATG
<i>CG4398</i>	GATTTGCGCTTGAACCTCTGC	TGAGACTGGTGCTGCAATTC
<i>CG4565</i>	CGCAGCTGTGGTTCAGGTAG	ATGGACGAATCTGAAACAGC
<i>CG6701</i>	ACGAAAATTGCGGATGAGTC	ACGCAGCGGGTTAACATTAC
<i>CG7080</i>	CTTGTAAGCAGCCCTCCACTC	CTTTGGTTAGCTGCCAGGAC
<i>CG7173</i>	CTGGGTCATCGGTGTATTCC	CAGGGATCTCCAGTTTCAG

TABLA SUPLEMENTARIA 5 (Continuación)

GEN	Oligonucleótido AS T7	Oligonucleótido S T3
<i>CG7201</i>	CCTCCACTACGCCATAGAGC	AAGGTGTTAAGGCGATGCAG
<i>CG7906</i>	GGCACAAATGGACAGTGATG	ACTACGGAAGCCGCAACTAC
<i>CG8773</i>	TTCGTCGTACAAAAGCGATG	ACAAGTGAACCCGGCACTAC
<i>CG8945</i>	ATTTGGCCTTGAAGTTGTGC	TTGTGCTCTTGATCGTGGTC
<i>CG8965</i>	CAAAGTGTCCCAGTCCCTTG	ATCCATGGAGGTAGCTGTGC
<i>CG9460</i>	GCTGCCTGTAGAGGGACATC	CGTGTTCACTTCTGCTGCTC
<i>dlg1</i>	GCTCCTCCTCATCCTGACTG	GGATTTCGGATACGGACTCG
<i>dy</i>	TACCCAGGAGCACGATTAGC	GAGCAGGCACCTACTTCGAG
<i>Ect4</i>	ATGTCGGTGTTACCCTGCTC	GCTCCCTGCAAGAAGATGAG
<i>Ets21C</i>	GTCGTAGTTTCCCGCAGAAG	AATCCAGCTGTGGCAGTTTC
<i>fs(1)Yb</i>	CCGAATCAATCCATTTTTGG	TGTTGCTCCAACTGCTGAAC
<i>Gp210</i>	ATCAACAATGGCGAAAAAGG	TTCGCCGAGGAAGTACAAAC
<i>Gr64a</i>	GTGCCACTGTCTGTGTGGTC	CGTGCACTTTTGTGTGGAAC
<i>His1:CG31617</i>	CAGCCGTAGTCTTCGCTTTC	CACCAGCGACAGTTGAGAAG
<i>His2A</i>	TAATTACAACAAATTGCCAAGC	ATGTCTGGACGTGGAAAAGG
<i>l(2)03659</i>	AGCCAAACTAATGCCACCTG	CAGTCCGAAGAGCTGGGTAG
<i>l(3)S147910</i>	TGCATTGTTTTATGCCTTCG	TGGATTTTAATCAGAGTTTCGAG
<i>mre11</i>	TCGCATTAAACATGCAGGAC	TCCTGTTTCCCTGGAGATTC
<i>mthl4</i>	ACAGAAGTGGGGTGCAATTC	TTGATGCCAAAATCAAATGC
<i>mthl8</i>	CATGAAGTGTCCAGTGAACG	ATGGCGCAGTTCTGCATTC
<i>mus205</i>	CACGATCATTGCCAGTATG	ATTCGGCAAATCCAGATGAG
<i>NetA</i>	GATCGAAGTGAATGGCTTG	GCATTCCGGACTTTGTGAAC
<i>nod</i>	ACCTAGCAGCTCCAGCAGAG	CAGCAGCAGCTCAAAGTACG
<i>Obp56a</i>	ACTTGAGGCGGTATCACAC	CCCTTAATCTGAGCGACGAG
<i>opa</i>	GTCCGCTTGTGGATCTTGAG	AACACCACCGCCAGTAACAG
<i>Oseg5</i>	AGTGGCTTGATGGATATGTGC	CGCGAATCTGCAAGAAAAAC
<i>pdm2</i>	GACCAGAGAGTTTGGCTTGG	TTGAGGACATCGGGAAAGTC
<i>PGRP-LC</i>	AATGCGGGGTATCCTGTC	TGTTCCAATGCGAAACGTAG
<i>phr</i>	GCTGGCAGGCTGCTTTATAC	TCGAAGGCTTTGTTGGTTTC
<i>ppk20</i>	GGCCTGGCAGATACTTACG	ATTCGGTCAAACCGACAGAG
<i>Ptpa</i>	CACTGCCCCAGATGAAGG	GGCAATTGCGAAGAAGGTG

TABLA SUPLEMENTARIA 5 (Continuación)

GEN	Oligonucleótido AS T7	Oligonucleótido S T3
<i>rev7</i>	ACCCTAGCCAAAGGAAGGAG	GATTAAGGCCGACATCATCG
<i>scrib</i>	ACTCGGTTTCGTCTTGATG	CGATGAGGATGATGATGACG
<i>shn</i>	TGTTTGAGGAGAGCGATGTG	ACGGCCAAGCATTACAAAAC
<i>SoxN</i>	CAGAGCTGTATTCCCGCTTC	TGCATTGAGCAGCCTAACTG
<i>Trx-2</i>	TTGATGACATCCTCCAGACG	CTGGTGGTGCTGGATTCTT
<i>wrapper</i>	GCTCAACACTTCCGCTTTTC	GATGTGGCTCTGGTGGACTC

GEN	Oligonucleótido AS T3	Oligonucleótido S T7
<i>agt</i>	ACTTTTCATCGGCCAGAAGC	AAACACCCAGATTCGTTTGG
<i>CG10041</i>	TCAAGCGGTTTGAGGAAAAC	CAACTGTGTCGACCACGAAG
<i>CG10225</i>	GTTGTGATGGCCGTTAGTC	CAAGTGCAGGTGAAGACAGC
<i>CG13850</i>	TGTTAGCGACCACACAAAGC	AAACGACGATCCCAAAGATG
<i>CG14590</i>	CTCCAAGCCAGCTTCGTTAC	CACGAGTCAATGGAATGCAG
<i>CG14869</i>	ACTGGCCAATGCGATTGTAG	GTGAGGGTGTGGAGAAGAGG
<i>CG16713</i>	TCTTCACAGATTTCCCTCGAA	GCTCTCATCGCAATCAGCTA
<i>CG18255</i>	GCGCTGATAGCGATAGTTCC	TTATCGGGGTGAAAACGAAG
<i>CG18410</i>	GTCTTCTTGCCAGCTTTTC	CGAGATCCGGACTACCAGAG
<i>CG18563</i>	TCCCGGTTTATTTCACTTCG	ATCCCTGTACGCAGATTTGG
<i>CG31098</i>	TGCTCTCAAACATGGTCAGC	GAACCGGCAGCAAGAACTAC
<i>CG32055</i>	CTTTCGACGATTCCTTGAGC	GGGAATATTTTACGCGTTGC
<i>CG7420</i>	CATTTTCGGTGCTGTTGTTG	AGCCATCACGTTGACCAAAC
<i>Dsno</i>	GCGAGCCTCTGATTGTTCTC	ATTTGGGCAGTGAATTCGAG
<i>Idgf4</i>	GAACCTGTGCTGGCCAGTG	TCGATGTGCCCGCTATTATC
<i>lola</i>	TGTAGGGGCAGTAGGGACAC	TAGATCCCTCGACCATTTCG
<i>m4</i>	ACGATCCTGGGGGATAGC	CCAACAACACCATGACCATC
<i>mod(mdg4)</i>	AGGACTTGGTCGCATTGTTT	GTCTTTCCGTCGAGTTGTGC
<i>Msh6</i>	TGCTTCCACTGGTCGTAGTG	CTCCTTGCTCTCCACTTTGG
<i>nimB2</i>	CTGCAGATGCAGAAGTTTGG	CAATTGCGGGGATCAGTTC
<i>Nos</i>	GATTACGGCAGCCAAAGAAG	TTCGCTGACTGTGAATACGG
<i>phr6-4</i>	TCTCCTCGAAAGACGACTCC	GCATGGAGGAATCCCTAAAG

TABLA SUPLEMENTARIA 5 (Continuación)

GEN	Oligonucleótido AS T3	Oligonucleótido S T7
<i>pinta</i>	CATAGAAATCGGCGTTCTCC	CTGCTGCTAAAGCTCGATCC
<i>Pka-C1</i>	ACTCCTTGGCACACTTCTCG	GTGTCATGATCGTCCAGCAC
<i>pnt</i>	CGGTCCACGAAATGAACTC	ACTGTCAATGGCAGCGGTAG
<i>Ptr</i>	CGTCGTCTAAATCGCTCCTC	TCACCGCTCACATCTGCTAC
<i>Rad1</i>	AATCAGTGTTGAGCAAAGGAA	GCAAGTCTCCGAAGATGGTC
<i>sage</i>	GGAGCGCAGTAAGTCAAAGG	AGTTTTGGTGCCCGTATCAG
<i>spirit</i>	GAATTCGGGACTGAACTGG	GAGCCACCCAGTCAGGTG
<i>spz</i>	GCAGCAGGAAGGGATCTTG	CTTTGTCTTCCCCGATTCC
<i>swi2</i>	CACAATCCAAGGAAGCTCGAC	CGGGACAATCCCCACTAC
<i>tej</i>	CACAGCATAAGCTGGAATGG	CAAATGGCATGGATAACTGC
<i>tey</i>	CAAGGCGTACTTCCTCTTGC	CTGCATAATGCGGGGAAG
<i>unc-13</i>	ACCCATAAAGCGCTTGTGAC	GTCAAGGCCTCCAGAGACAG

**Tabla Suplementaria 5. Oligonucleótidos utilizados para la generación de sondas anti-sentido (AS) y sentido (S).** Se indican los genes para los cuales se generaron sondas anti-sentido (AS) y sentido (S) mediante PCR y los oligonucleótidos correspondientes para cada gen, indicando al inicio de cada columna la ARN polimerasa (T7 o T3) con la que se preceden.







## Anexo II



The Spalt transcription factors regulate cell proliferation, survival and epithelial integrity downstream of the Decapentaplegic signalling pathway

María F. Organista and Jose F. de Celis

Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma de Madrid,  
Cantoblanco, Madrid 28049, Spain

Author for correspondence: [jfdecelis@cbm.uam.es](mailto:jfdecelis@cbm.uam.es)

**Key Words:** Drosophila, imaginal discs, wing, cell death, Dpp signalling, Spalt

**Running Title:** Sal functions in Dpp signalling

## SUMMARY

The expression of the *spalt* genes is regulated by the Decapentaplegic signalling pathway in the *Drosophila* wing. These genes participate in the patterning of the longitudinal wing veins by regulating the expression of vein-specific genes, and in the establishment of cellular affinities in the central region of the wing blade epithelium. The Spalt proteins act as transcription factors, most likely regulating gene expression by repression, but the identity of their target genes in the wing is still unknown. As a preliminary step to unravel the genetic hierarchy controlled by the Spalt proteins, we have analysed their requirements during wing development, and addressed to what extent they mediate all the functions of the Decapentaplegic pathway in this developmental system. We identify additional functions for Spalt in cell division, survival, and maintenance of epithelial integrity. Thus, Spalt activity is required to promote cell proliferation, acting in the G2/M transition of the cell cycle. The contribution of Spalt to cell division is limited to the central region of the wing blade, as they do not mediate the extra growth triggered by Decapentaplegic signalling in the peripheral regions of the wing disc. In addition, Spalt function is required to maintain cell viability in cells exposed to high levels of Decapentaplegic signalling. This aspect of Spalt function is related to the repression of JNK signalling in the *spalt* domain of expression. Finally, we further characterise the requirements of Spalt to maintain epithelial integrity by regulating cellular affinities between cells located in the central wing region. Our results indicate that Spalt function mediates most of the requirements identified for Decapentaplegic signalling, contributing to establish the cellular qualities that differentiate central versus peripheral territories in the wing blade.

Aceptado en “Open Biology”.

# Signalling Pathways in Development and Human Disease: A *Drosophila* Wing Perspective

Cristina Molnar, Martín Resnik-Docampo, María F. Organista,  
Mercedes Martín, Covadonga F. Hevia and Jose F. de Celis  
*Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", CSIC and UAM  
C/Nicolás Cabrera 1, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid  
Spain*

## 1. Introduction

The proteins involved in signalling are organised in several signalling pathways, and both these proteins and their molecular interactions are conserved during evolution. In this chapter we describe the genetic structure of the main conserved signalling pathways identified in multicellular organisms, focusing in those signalling pathways in which the activation of cell receptors by proteins with ligand activity is linked to transcriptional responses. These pathways play key roles during normal development, and their de-regulation has been implicated in a variety of human diseases. We will emphasize the conservation of the proteins and mechanisms involved in each of these pathways, and describe the *Drosophila* wing imaginal disc as an experimental system to dissect cell signalling in vivo. Finally, we will discuss some of the strategies that are been used to identify additional components of signalling pathways in *Drosophila*. Our main aim is to underline the general structure of signalling pathways, the relevance of signalling for normal development and for the appearance of multitude of human diseases, and describe several strategies that *Drosophila* genetics offers in biomedical research.

## 2. General structure of signalling pathways in multi-cellular organisms: Ligands, receptors, transducers and transcriptional outputs of the Notch, EGFR, InR, Wnt, TGF $\beta$ , BMP, Hippo and JNK pathways

Signalling pathways are molecular modules used to convey information among cells. Each pathway is formed by several components connected by molecular recognition and organised in a hierarchical manner, starting with a ligand and ending with a transcription factor. The temporal and spatial expression of the ligands determines the domain of activation of each signalling pathway. The expression of ligands is subject to transcriptional regulation defined by the combination of transcription factors present in the ligand-producing cell (see for example Bachmann and Knust, 1998; Haenlin et al., 1990; Haenlin et al., 1994; Parks et al., 1995; Vargesson et al., 1998). The outcome of each pathway is the activation of a specific transcription factor, and consequently, in many respects a signalling pathway is a molecular device used to coordinate gene expression programs in cell populations. In these roles they are instrumental during multicellular development and



adult tissue homeostasis, regulating a variety of cell behaviours including cell division, apoptosis, migration and differentiation.

The components of each signalling pathway can be operationally grouped into ligands, receptors, transducers and transcription factors (Table 1).

Pathway/Organism	Ligands		Receptors		Transducers		Transcription Factors	
	Fly	Human	Fly	Human	Fly	Human	Fly	Human
<b>EGFR</b>	Argos Spitz Vein Gurken Keren	Argos EGF HB-EGF TGF- $\alpha$ NRG1-4  EPR	EGFR Sevenless Torso  HER 2-4	EGFR ROS1  HER 2-4	Sos Grb Ras Raf dMEK  rolled dPI3K dPTEN dPDK1 AKT	Sos1 Grb2 K-Ras /H-Ras/N-RAS SHC MEK 1/2 MEKK 1/3 ERK 1/2 PI3K PTEN PDK1 AKT	Yan Pointed 1-2	ETV ETS (ELK1) AP1 SRF
<b>SWH</b>	dachsous	DCHS 1 DCHS 2	Fat CRB	Fat 1-3 Fat 4	Hippo Salvador Kibra Expanded Merlin Mats Warts dRassf1 Dachs	MST1,2 hWW45/SAV1 Kibra Willin/FRMD6/Ex2 MER/NF2 MOBK1B LAT 1-2 RASSF1	Yorkie	YAP,TAZ
<b>NOTCH</b>	Delta Serrate	Delta-4/A-D Serrate Jagged1-2 DII3-4	Notch	Notch1 Notch2-4			Su(H) Notch-i	CSL NICD
<b>InR</b>	Ilp1-7	Insulin IGF1-3	InR	IGF1R	dPI3K dPTEN dPDK1 AKT dRheb dTSC1/2	PI3K PTEN PDK1 AKT Rheb TSC1/2	dFOXO	FOXO
<b>TOR</b>	Leucine Glutamine	Leucine Glutamine	Slimfast pathetic	SLC7A5/SLC3A2	dRagA/C dMAP4K3 dTOR draptor drictor dS6K d4EBP1	RRAG B/C hMAP4K3 TOR Raptor Rictor S6K 4EBP1	Tif-1A	UBF TIF-1A SL1 Pol I
<b>JNK</b>	Eiger PVF	TNF PDGF	Wengen PVR	TNFR1 TNFR2 PDGFR	dTRAF1-2 dRac1 Msn Dsh MAP4K3 dTAK1 dASK1 Slpr dMekk1 Hep BSK	TRAF1-2 Rac1   MAP4K3 TAK1 ASK1 MEKK1/4 MKK4/7 JNK1/2/3	Jra Kayak	Jun Fos
<b>TOLL</b>	Spaetzle		Toll	TLR1,2,4,5,6,11	Pelle Cactus kinase Tube Pellino Myd88 Gprk2	IRAK1,3   MYD88  TIRAP IRAK4 TRAF6 TAK1 TAB1 MKK3-4/6-7 TBK1 IRF3,7	Dif/Dorsal Deaf1	NFKB1 DEAF1
<b>JAK/STAT</b>	Upd 1-3	IFN I (a/b) IFN II (g)	Dome Mom	Gp130	Hop	JAK1/2/3 TYK2	STAT92E	STAT1a/ b STAT2 STAT3a/b STAT4a/b STAT5A /B/6

Continuation Pathway/Organism	Ligands		Receptors		Transducers		Transcription Factors	
	Fly	Human	Fly	Human	Fly	Human	Fly	Human
<b>WNT</b>	Wingless	WNT 1 WNT 2-16	Frizzled Arrow	Frizzled LRP 5 LRP 6  ROR2	Dishevelled Axin Zeste-White 3  APC Armadillo	Dishevelled Axin GSK3  APC b-Catenin DVL	Pangolin	LEF/TCF
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Dpp  Gbb Activinb   Scw Daw Mav Myo	BMP2,4 BMP5-8  Activin A,B TGFB1,2,3 Nodal GDF 5 MIS	Tkv  Sax Wit Babo  Put	BMPIA,IB ALK-1,2,6  ActRIB/AcvR-i/ALK4/TbRI BMPII/ TGbR-II/  AMHR ActR-II, IIB	Mad dSmad2 Medea Dad	Smad1,5,8 Smad2,3 Smad4,4b Smad6,7	Mad dSmad2 Medea	Smad1,5,8 Smad2,3 Smad4,4b
<b>Hh</b>	hh	Shh Ihh Dhh	Ptc	Ptc1 Ptc2	Smo Costal2  Fused Su(Fu)  PKA CKI GSK3 Kurtz Slimb Gprk2	SMO KIF7 KIF3A IFT88/IFT172 Fused SUFU MIM Iguana FKBP8 SIL Rab23 PKA CKI GSK3 b-arrestin-2 (beta)TrCP GRK2	Cubitus-i	Gli-1 Gli-2,3

Table 1. Main components of the principal signalling pathways in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens*.

For references see: EGFR: Kataoka, 2009/Shilo, 2003; SWH: Gruscne et al., 2010/Kango-Singh and Singh, 2009/Matallanas et al., 2008; Notch: Bray 2006/Schwanbeck et al., 2010; InR: Ma and Blenis, 2009; TOR: Hietakangas and Cohen, 2009/Rosner et al., 2008/Zoncu et al 2011; JNK: Igaki 2009- Toll' So and Oucni 2010/ Valanne et al., 2011; JAK/STAT: Rane and Reddy, 2000/Hou et al., 2002/Wright et al., 2011; Wnt: Seto and Bellen, 2004/Chien et al., 2009; TGF- $\beta$ : Raftery and Sutherland, 1999/Massague and Wotton, 2000/Waite and Eng, 2003 and Hh: Ruiz-Gomez et al., 2007/Jacob and Lum, 2007.

In the simplest example, that of steroid hormones, a single protein can recognise a ligand molecule and also acts as a transcription factor (Stanisic et al., 2010), but, in general, different proteins can be unequivocally assigned to each category in different pathways. Ligands are mostly proteins that can be secreted from the cell or directly presented in the cell membrane to neighbouring cells (Figure 1). In general, ligands are subject to considerable post-transcriptional modifications, including ubiquitination (Delta/Serrate in the Notch pathway; Le Bras et al., 2011), lipid modifications (Hedgehog family of proteins; Steinhauer and Treisman, 2009), proteolytic processing from a larger precursor to form the active peptide (TGF $\beta$  superfamily members and EGF/FGF ligands; Zhu and Burgess, 2001; Urban et al., 2002), palmitoylation and glycosylation (Wnt and EGFR ligands; Miura et al., 2006; Steinhauer and Treisman, 2009) and glycosylation (JAK/STAT ligands) (Figure 1). These modifications are required for the secretion of the ligand and its spreading through the tissue, and they also determine their ability to bind and activate their receptors. In addition,

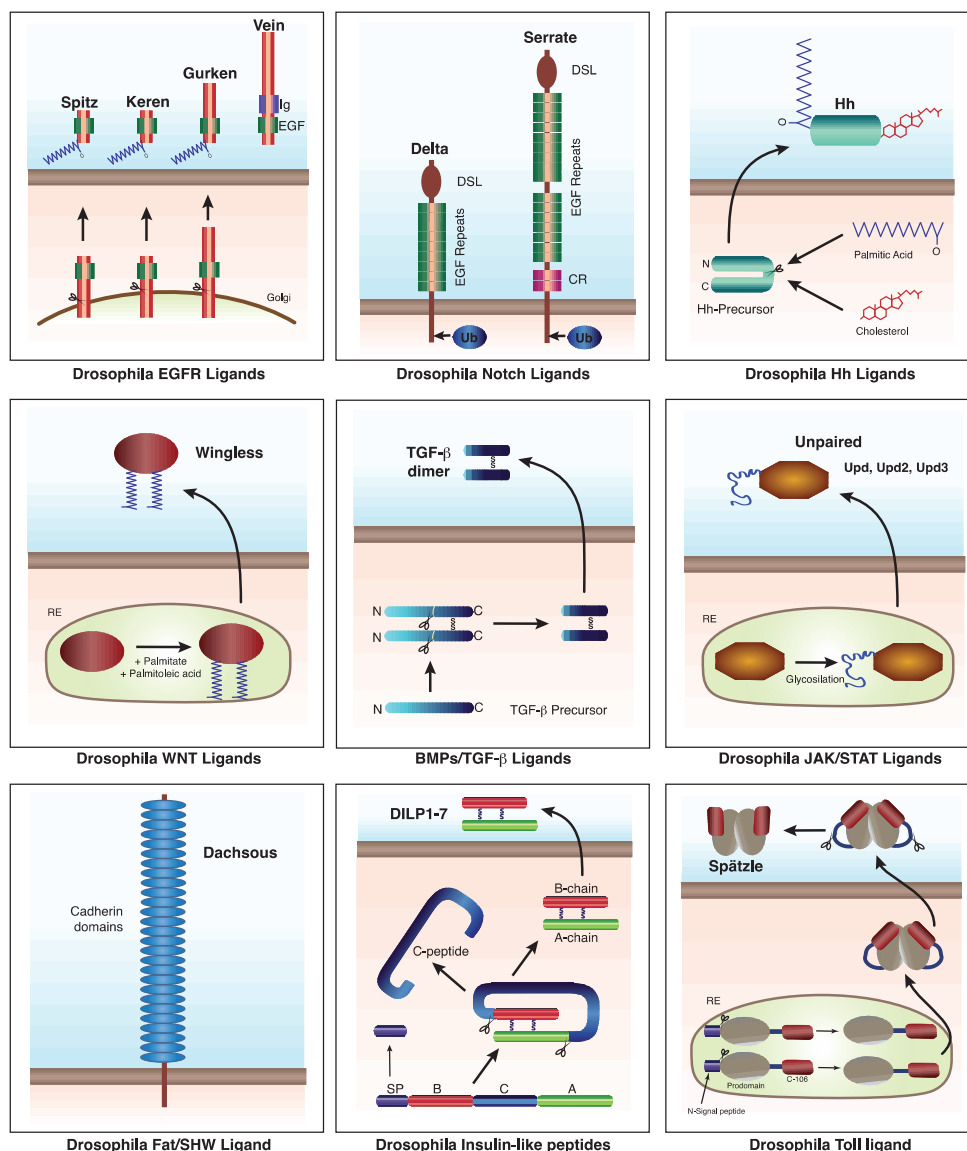


Fig. 1. Schematic representation of the ligands and their post-transcriptional modifications. Upper panels: EGFR, Notch and Hh ligands, middle panels: Wnt, BMP/TGF $\beta$  and JAK/STAT ligands and bottom panels (SHW, Insulin and Toll ligands).

most secreted ligands display strong interactions with several components of the extracellular matrix, which help to establish their diffusion range and to shape the concentration of active ligand at a distance from the ligand-producing cells (Jackson et al., 1997; Baeg et al., 2001; Araujo et al., 2003; Bartscherer and Boutros, 2008). The distribution of

the ligands is also affected by interactions with their receptors, as ligand-receptor interactions remove the ligand from the extra-cellular milieu and regulate the concentration of the ligand through endocytosis and subsequent lysosomal degradation or recycling of ligand-receptor complexes (Lecuit and Cohen, 1998; Chen and Struhl, 1996; Funakoshi et al., 2001; Pfeiffer and Vincent, 1999).

Receptors are in general transmembrane proteins with two well-differentiated activities. Thus, they interact with the ligand through their extra-cellular domain, and recruit different components of the transduction machinery in their intra-cellular domain (Figure 2). The cell biology of receptors is complex and diverse, but in general includes mechanisms to ensure the correct trafficking of the receptor through the Endoplasmic reticulum-Golgi network, post-transcriptional modifications during trafficking to synthesize the active form of the protein, localization of the receptor to apical domains in the cell membrane, interaction of the receptor with different co-receptor molecules, and turn-over mechanisms that regulate the number of activated-receptors in the cell membrane and other intracellular compartments (Piddini and Vincent, 2003; Hoeller et al., 2005; Mills, 2007; Sorkin and von Zastrow, 2009; Bethani et al., 2010). Similarly, the activation of the receptor by binding to appropriate ligands uses different mechanisms that rely in the clustering of receptor complexes, phosphorylation of receptor molecules after complex formation (EGFR and TGF $\beta$ ), or conformational changes that allow the proteolytic processing of the receptor (Notch) or its interaction with specific transduction components (Wnt; Figure 2).

The receptors act on their downstream transducers through a variety of mechanisms that include phosphorylation (EGFR/InR and JAK; Arbouzova and Zeidler, 2006; Pfeifer et al., 2008; Hombria and Sotillos, 2008 Avraham and Yarden, 2011) and TGF $\beta$  receptor complexes; Miyazono et al., 2010), the recruitment of intracellular transducers after conformation changes (Wnt receptors; Angers and Moon, 2009), or the indirect modification of the phosphorylation state and subcellular localization of its transducer (Hedgehog receptors; Ruiz-Gomez et al., 2007). In a particular case (Notch; Bray, 2006), the receptor itself directly contributes to modify the composition and activity of transcription complexes (Figure 2).

The components of the transduction machinery downstream of the receptor are also heterogeneous, ranging from the simplest cases in which the receptor itself becomes part of a transcription complex (Notch) or directly modifies by phosphorylation a transcription factor, triggering a change in its subcellular localization from the cytoplasm to the nucleus (Smad and Stat proteins in TGF $\beta$  and JAK pathways, respectively; Miyazono et al., 2010; Hou et al., 2002). In other cases the receptor (Wnt receptors; Angers and Moon, 2009) or a transducer regulated by the receptor (Smoothed in the Hh pathway; Ruiz-Gomez et al., 2007) acts as a scaffold to recruit and sequester different components that prevent the accumulation of a transcription factor in the nucleus ( $\beta$ -catenin and Gli, respectively). Finally, in the cases of Sav/Warts/Hippo (SWH; Harvey and Tapon, 2007; Halder and Johnson, 2011), Toll (Valanne et al., 2011), and receptors with tyrosin-kinase activity such as EGFR (Shilo, 2003) and InR (Brogiolo et al., 2001), the activation of the receptor is communicated to the responding transcription factor through a linear cascade of phosphorylation (EGFR, InR and SWH) or proteolytic events (Toll) that end in the generation of active forms of the transcription factor localised in the nucleus (ETS proteins for EGFR and Rel/Dorsal for Toll), or in the exclusion from the nucleus of the transcriptional co-activator Yorkie/YAP (SWH) (Table 2).

By using these mechanisms, the state of the pathway changes the nuclear localization of a transcription factor that binds to the DNA with sequence-specificity. In the simplest cases

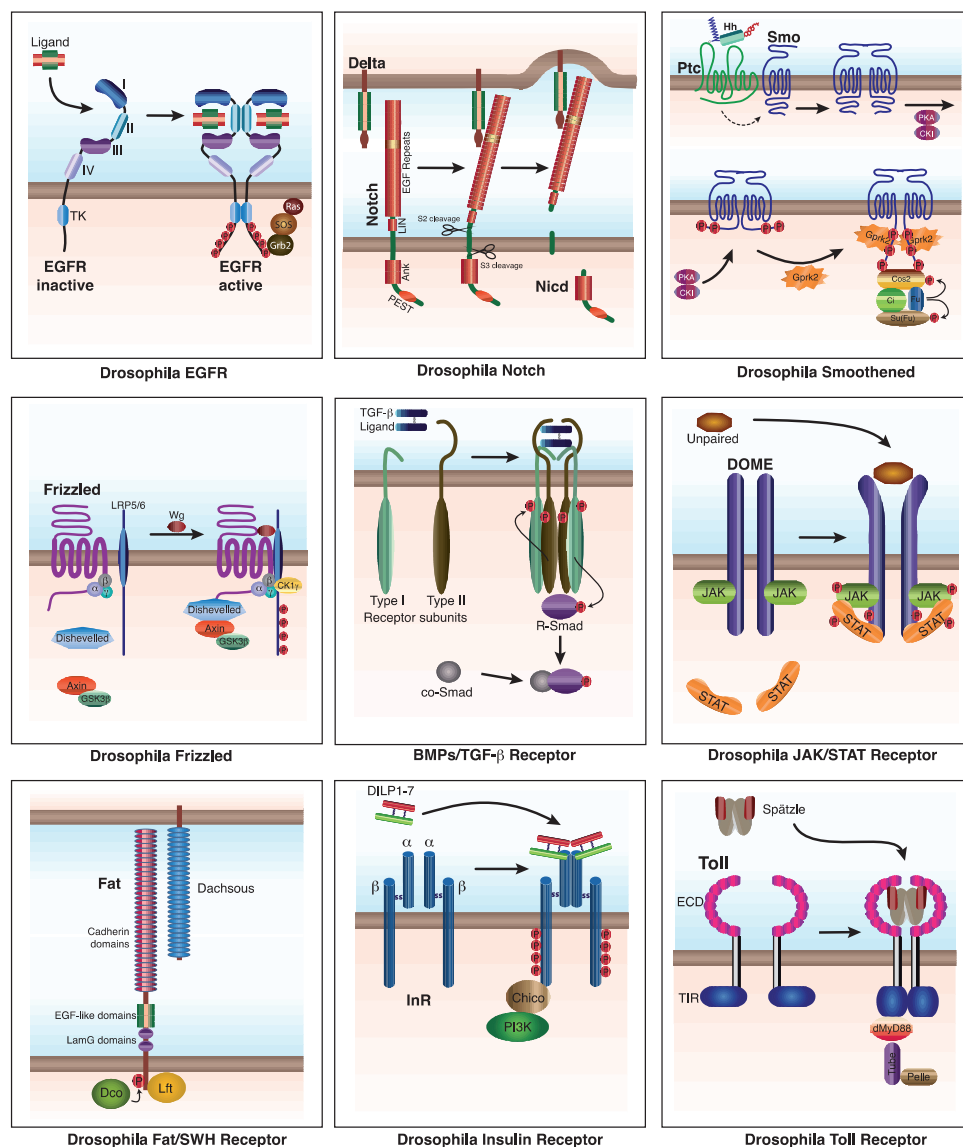


Fig. 2. Schematic representation of the receptors and their mechanisms of activation

this is accomplished directly by the receptor itself, which re-localise to the nucleus upon ligand binding (Notch). In the case of York1/YAP (SWH; Harvey and Tapon, 2007) and Foxo (InR; Van Der Heide et al., 2004; Greer and Brunet, 2008), pathway activity prevents or promote, respectively, their entrance into the nucleus, and in the case of Dorsal/Rel (Gerondakis et al., 2006) the pathway triggers the proteolytic processing of a protein that sequesters this transcription factor in the cytoplasm (Table 2). In other pathways the

transcription factor resides in the nucleus, where it acts as a member of a transcriptional repressor complex. In these cases, the transcriptional output of signalling is determined by the induction of a transition, regulated by the pathway, from a transcriptional repressor to a transcriptional activator (Table 2). This transition is accomplished using different mechanisms such as the generation of an intracellular fragment of the receptor (Notch; Bray, 2006), the phosphorylation of the transcription factors (ETS in EGFR; Baonza et al., 2002 and Smads in TGF $\beta$ ; Miyazono et al., 2005) or the inhibition of the proteolytic processing of the transcription factor (Gli in Hh and  $\beta$ -Catenin in Wnt; Nusse, 1999).

Pathway / Organism	TF		Activation of TF		Localization/State of TF		Co-TF	
	Fly	Human	Fly	Human	Fly	Human	Fly	Human
EGFR	Pnt/Yan	ETS/ETV	Phosphorylation		C/N; R/A		Gro MAE	TLE -
Hh	Ci	Gli-1, Gli-2, Gli-3	Proteolysis		C/N; R/A		dCBP	CBP
InR/TOR	dFOXO	FOXO	Phosphorylation		N/C; R/A		-	-
JAK/STAT	Stat92E	STAT1-2-3-4-5-6	Phosphorylation		C/N; A		Ept	TSG101
JNK	Jra/Kay	Jun/Fos	Phosphorylation		C/N; A		-	-
NOTCH	Su(H)-NICD	CSL-NICD	Proteolysis		C/N; R/A		Mam -	MANL1-3 SKIP
SWH	Yki	Yap, Taz	Phosphorylation		N/C; A		Sd Hth	TEAD1-4 Meis1-3
TGF $\beta$	D $\beta$ Smad2-Med/Mad-Med	Smad2-Smad4/Smad3,Smad5-Smad4	Phosphorylation		C/N; R/A		Shn dCBP dSki/dSno	HIVEP3 CBP SKIL
TOLL	Dif/Dorsal	NF $\kappa$ B	Proteolysis		C/N; A		dCBP Gro TAF <sub>60/110</sub> Twi	CBP TLE TAF6 TWIST1
WNT	Arm-Pan	$\beta$ -catenin-TCF	Proteolysis		C/N; R/A		Gro dCBP Lgs Brm	TLE CBP BCL9L BRG1

Table 2. Transcription factors and their mechanism of activation. Abbreviations: Transcription Factor (TF), Pointed (Pnt), Cubitus interruptus (Ci), Signal-transducer and activator of transcription protein at 92E (Stat92E), Jun-related antigen (Jra), Kayak (Kay), Suppressor Hairless (Su(H)), Notch intracellular domain (NICD), Yorkie (Yki), Mothers against dpp (Mad), Medea (Med), Dorsal-related immunity factor (Dif), Armadillo (Arm), Pangolin (Pan), Groucho (Gro), CREB-binding protein (CBP), Erupted (Ept), Tumor Susceptibility Gene-101 (TSG101), Mastermind (Mam), Skl-interacting Protein (SKIP), Scalloped (Sd), Homothorax (Hth), Schnurri (Shn), Human immunodeficiency virus type I enhancer binding protein 3 (HIVEP3), Sno oncogene (Sno), SKI-like oncogene (SKIL), TBP-associated factor "60/110 (TAF"60/110), Twist (Twi), Legless (Lgs), Brahma (Brm). Localization/State of TF: Cytosolic (C) and nuclear (N) subcellular localization. Function as a transcriptional activator (A) or repression (R). TF that traslocate to the nucleus upon activation (C/N) or from the nucleus to the cytoplasm (N/C). For references see: EGFR: Vivekanand et al., 2004/Hassen and Paroush, 2007; Hn: Akimarti et al., 1997a/Chen et al., 2000; InR/Tor: Ma and Blenis, 2009/Hietakangas and Cohen, 2009/Resnik-Docampo and de Celis, 2011; JAK/STAT: Gilbert et al., 2009 ; JNK: Igaki, 2009; NOTCH: Zhou et al., 2000/Petcherski and Kimble, 2000/Bray, 2006; SWH: Halder and Johnson, 2011; TGF $\beta$ : Feng et al., 1998/Janknecht et al., 1998/Pouponnot et al., 1998/Waltzer and Bienz, 1999/Luo et al., 1999/Strochein et al., 1999/Sun et al., 1999a/Sun et al., 1999b/Dai et al., 2000/Barrio et al., 2007; Toll: Dubnicoff et al., 1997/Aklkmaru et al., 1997b/Pham et al., 1999 and Wnt: Waltzer and Bienz, 1998/Roose et al., 1998/Nusse, 1999/Barker et al., 2001/Hoffmans and Basler, 2004.

In all cases, the presence in the nucleus of a transcriptional activator in response to signalling modifies the expression of a battery of target genes, leading to changes in cell behaviour that are conditioned by the state of the responding cell. In this manner, some aspects of the transcriptional landscape of the ligand expressing cells are communicated to the receiving cells, where a novel pattern of transcription can be established. Thus, the transcription factors regulated by each signalling pathway contribute to the combinatorial of regulators present in a given cell, and this, combined with the structure of gene regulatory sequences, makes the transcriptional responses to a pathway cell type specific (Bonn and Furlong, 2008; Chopra and Levine, 2009). At this time, little is known about the number and identity of target genes whose expression are directly regulated by signalling and whose function contributes significantly to the cellular response to signalling. This is an area of intensive research, and the use of chromatin immunoprecipitation techniques coupled with microarrays or deep-sequencing, the development of reporter systems for cell culture assays and the functional analysis of the identified target genes promise a much better understanding of the transcriptional responses to signalling in the near future (Yang et al., 2004; Miyazono et al., 2005; Friedman and Perrimon, 2006; Mummery-Widmer et al., 2009; Bernard et al., 2010; Kim and Marques, 2010).

### **3. General aspects of the biological roles play by signalling pathways during development**

The development of multicellular organisms relies to a large extent in the spatial and temporal generation of gene expression domains (Arnone and Davidson, 1997). In this manner, and under the perspective that signalling pathways are mostly elaborate devices to regulate transcription, it is no wonder that these pathways play prominent roles during the development of all organisms. Their key contribution is mostly based in their ability to communicate transcriptional stages between cell populations and generate spatial domains of gene expression. Other characteristics that make signalling a powerful system to regulate cell behaviour are the quantitative response to signalling, the operation of elaborate feedback mechanisms, positive and negative, that modulate the intensity and duration of signalling (Perrimon and McMahon, 1999), and the existence of cross-interactions between pathways (McNeill and Woodgett, 2010). These cross-interactions occur both at the level of transcription, in which one pathway regulates the expression of others pathway ligands, or by interactions in which one pathway affects the activity of components belonging to a different pathway (Hasson and Paroush, 2007; McNeill and Woodgett, 2010). All these characteristics confer a great versatility to the function of signalling during development, and also contribute to the disastrous consequences that signalling miss-regulation has in different genetic disorders (Harper et al., 2003; Logan and Nusse, 2004; Inoki et al., 2005; Bentires-Alj et al., 2006; Jacob and Lum, 2007; Gordon and Blobel, 2008; Rosner et al., 2008; Gordon and Blobel, 2008; Table 3). To summarize, we have divided the biological roles played by signalling into the following categories:

1. Cellular responses that directly modify the metabolic state of the cell. This is best exemplified by the action of the InR/TOR pathway, which activity is used as a way to adjust the growth of the cell to the availability of nutrients (Brogiolo et al., 2001). In addition, this pathway is also used to coordinate the growth of different organs during development and adult tissue homeostasis (Zoncu et al., 2011).



2. Cellular responses that make cells to progress through the cell cycle, acquire migratory behaviour, enter into the apoptotic pathway or in general to make a transition between cell states. All pathways contribute in different cellular settings to modify a pre-existing cellular state (Thompson, 2010). For example, inputs from the BMP and FGF pathways regulate the entrance in apoptosis of inter-digital epidermal cells during vertebrate limb development (Pajni-Underwood et al., 2007); and TGF $\beta$ /BMPs also participate in regulating epithelial-mesenchymal transitions (Zavadil and Böttinger, 2005). BMP together with JNK also promote changes in the cytoskeleton that influence the movement of layers of cells during morphogenesis (Fernandez et al., 2007). On the other hand, several pathways have direct links with the cell cycle, either promoting the transitions between different phases of the cycle or triggering the entrance of cells in senescence (Campisi and d'Adda, 2007; Jones and Kazlauskas, 2001).
3. Regulation of alternative cell fates within populations of competent cells. Many pathways are engaged in the allocation of cell fates during development. The Notch and EGFR pathways fall in this class, regulating neural fates within proneural clusters in a process that employs Notch signalling to prevent neural fate and EGFR to promote this fate (Lage et al., 1997; Bray, 2006; Axelrod, 2010).
4. Regulation of spatial domains of gene expression within growing epithelia. The patterning of epithelial tissues is generally organised with respect to signalling centres. These centres operate as the source of ligands belonging to the EGFR, TGF $\beta$ /BMP, Wnt and Hh signalling pathways. Because these ligands act in a concentration-dependent manner at a distance from the cells expressing them, they can set adjacent domains of gene expression that partition the epithelium into different territories with specific gene expression patterns. This process is used reiteratively during the development of all multicellular organisms, and some examples are the patterning of segments in the embryonic epidermis and the subdivision of the imaginal discs into different territories in flies (Moussian and Roth, 2005), the generation of cell diversity in the vertebrate neural tube (Lupo et al., 2006), the establishment of the antero-posterior patterning in the vertebrate limbs and many others (Kumar, 2001; Duboc and Logan, 2009; Towers and Tickle, 2009; Arnold and Robertson, 2009).
5. Interactions between independent layers of cells. The development of tridimensional structures implies the coordination of cellular fates between cell layers of independent origin. This type of information transfer is at the base of the chains of inductive processes that pervade vertebrate development, and also contribute to set temporal and spatial patterns of cell migration during neurogenesis and myogenesis (Carmenta et al., 1998; Kimelman, 2006; Lupo et al., 2006; Wackerhage and Ratkevicius, 2008; Steventon et al., 2009; Mok and Sweetman, 2011).

The correct regulation of cell proliferation, differentiation and survival is essential for the proper development and homeostasis of all organisms. The key roles that signalling plays in these processes are likely behind the multitude of human diseases caused by genetic alterations in the components of most signalling pathways. We outlined in Table 3 some examples illustrating human pathologies associated to defects in signalling, showing that changes in the activity of almost any component of different pathways, from the ligands to the transcription factors, lead to specific pathologies. In this manner, both loss and gain of function mutations in different pathways have been described as potential causes of developmental disorders and disease. For example, the loss of TGF $\beta$  and SWH function, as

well as increase in JAK/STAT and EGFR, Wnt and Hh signalling are linked to tumour formation and progression in a variety of cell types (Massague et al., 2000; Waite and Eng, 2003; Harvey and Tapon, 2007), the miss-regulation of Toll signalling is related with defects in the immune response (O'Neill, 2003), and is associated to the increase in the susceptibility of immune diseases such as Lupus and arthritis (Constantinescu et al., 2008; Schindler, 2002). Mutations in Hh, TGF $\beta$  and Notch pathways have also been related with blood and circulatory system diseases such as hypertension or CADASIL, and defects in JNK pathway to neurodegenerative diseases including Parkinson and Alzheimer. Similarly, the mTOR pathway is implicated in metabolic diseases including diabetes and obesity as well as in ageing (Inoki et al., 2005). Finally, many developmental disorders, including Noonan syndrome, Cleft palate, Pallister Hall syndrome, Polydactyli or Tetra-Amelia, have been found associated to EGFR, TGF $\beta$ , Hh, and Wnt de-regulation (Tartaglia and Gelb, 2005).

Pathway	Component		Disease	References
EGFR	Receptors	EGFR	Most carcinomas (including Breast, Ovarian and Stomach)	Downward, 2003; Mendelsohn and Baselga, 2000; Kuan et al., 2001
		HER2	Breast cancer	Downward, 2003
	Transducer	B-Raf	Cardio-fascio-cutaneous syndrome, Colorectal cancer, Melanoma	Downward, 2003; Schubbert et al., 2007; Bentires-Alj et al., 2006
		Sos1	Noonan syndrome, JMML	Schubbert et al., 2007
		K-Ras	AML, JMML, Noonan, Myelodysplastic, Cardio-fascio-cutaneous and Leopard syndromes, Lung adenocarcinoma, Bladder, Colorectal, Kidney, Liver, Pancreas, and Thyroid tumors, Seminoma, Melanoma	Schubbert et al., 2007; Tartaglia and Gelb, 2005; Bentires-Alj et al., 2006; Downward, 2003; Bos, 1989
		H-Ras	AML, Costello and Myelodysplastic syndromes, Rhabdomyosarcoma, Neuro and Ganglioneuroblastoma, Adenocarcinoma, Bladder, Colorectal, Kidney, Liver, Lung, Pancreas and Thyroid cancers, Seminoma, Melanoma	Schubbert et al., 2007; Aoki et al., 2005; Bentires-Alj et al., 2006; Downward, 2003
		MEK 1/2	Cardio-fascio-cutaneous syndrome	Schubbert et al., 2007; Bentires-Alj et al., 2006
		C-Raf	AML	Zebisch et al., 2006; Kim and Choi, 2010

Pathway	Component		Disease	References
Hh	Ligand	Shh	Basal cell carcinoma	Beachy et al., 2004
	Receptor	Ptc1	Basal cell carcinoma, Medulloblastoma, Rhabdo and Fibrosarcoma	Taipale and Beachy, 2001; Peacock et al., 2007; Wechsler-Reya and Scott, 2001; Jacob and Lum, 2007
	Transducer	SUFU	Basal cell carcinoma, Medulloblastoma	Beachy et al., 2004
		Smo	Basal cell carcinoma, Sporadic tumours, Medulloblastoma	Taipale and Beachy, 2001; Beachy et al., 2004; Peacock et al., 2007
	TF	Gli	Glioma, GCPS, PHS, PAP-A	Ruiz i Altaba et al., 2002; Beachy et al., 2004; Ruiz-Gomez et al., 2007; Zhu and Lo, 2010
InR	Ligand	IGF1	Colorectal neoplasia	Jacobs, 2008
		IGF2	Colonic adenocarcinoma	Jacobs, 2008
	Receptor	IGF2R	Breast and Hepatocellular carcinomas	Jacobs, 2008
	Transducer	PKD1	Polycystic kidney disease	Rosner et al., 2008
		PTEN	Bannayan-Riley-Ruvalcaba and Proteus syndromes, Cowden and Lhermitte-Duclos diseases	Inoki et al., 2005
		TSC 1/2	Tuberous sclerosis and Lymphangiomatosis	van Slegtenhorst et al., 1997; Rosner et al., 2008
		STK11	Peutz-Jeghers syndrome	Hernan et al., 2004
		AMPK	Cardiac hypertrophy	Blair et al., 2001
		VHL	Angiomas, Hemangioblastomas, Renal carcinoma	Rosner et al., 2008
TOR	Transducer	MAP4K3	Pancreas cancer	Zoncu et al., 2011
		mTORC1	Obesity	Zoncu et al., 2011
		S6K1-IRS1	Diabetes type 2	Zoncu et al., 2011
		NF1	Neurofibromatosis	Zoncu et al., 2011
		p14	Growth defects, Immunodeficiency	Zoncu et al., 2011

Pathway	Component		Disease	References
JAK/STAT	Receptor	IL-2R $\gamma$ c IL-7Ra	X-linked SCID SCID	O'Sullivan et al., 2007 O'Sullivan et al., 2007
		IFN $\gamma$ RI	Susceptibility to Mycobacterial infection	O'Sullivan et al., 2007
	Transducer	JAK2	ALL, AML, MPDs, PV, SCID	Constantinescu et al., 2008 Schindler, 2002; O'Sullivan et al., 2007
		JAK3		
	TF	STAT1	ALL, AML, CLL, Brain, Breast, Lung, Head and Neck tumours, Erytroleukemia, Susceptibility to Mycobacterial infection	Bromberg, 2002; O'Sullivan et al., 2007
		STAT3	AML, CLL, LGL, Crohn's disease, Brain, Breast, Head, Lung, Neck, Ovarian, Pancreas, Prostate and Renal tumours, Mycosis fungoides, Burkitt's, Hodgkins and Anaplastic large cell lymphomas, Myeloma, Melanoma	Bromberg, 2002; O'Sullivan et al., 2007
		STAT4	Chronic obstructive pulmonary disease	O'Sullivan et al., 2007
		STAT5	ALL, AML, CML, Crohn's disease, Erytroleukemia	Bromberg, 2002; O'Sullivan et al., 2007
JNK	Transducer	JNK1	Diabetes type 2	Waeber et al., 2000
		JNK2	Atherosclerosis	Ricci et al., 2004; Sumara et al., 2005
		JNK3	Parkinson Disease	Resnick and Fennell, 2004
		p38	Alzheimer Disease	Smith et al., 2006
		MKK4	Breast, Biliary and Pancreatic carcinomas	Su et al., 1998
Notch	Ligand	Dll-3	Spondylocosta dysostosis	Harper et al., 2003
		Jagged-1	Alagille Syndrome	Harper et al., 2003
	Receptor	Notch-1	ALL	Ellisen et al., 1991; Harper et al., 2003
		Notch-3	CADASIL	Harper et al., 2003
		Notch-4	Lung Cancer, Esquizophrenia and Alopecia aerata	Dang et al., 2000; Wei and Hemmings, 2000; Ujike et al., 2001; Tazi-Ahnini et al., 2003

Pathway	Component		Disease	References
TGF $\beta$	Ligand	TGF $\beta$	Mammary, Prostate and Renal cancers	Rooke and Crosier, 2001
		TGF1	Camurati-Englemann disease	Gordon and Blobbe, 2008
		GDF-5	Hunter-Thompson and Grebe-type chondrodysplasias, Brachydactyly type C, Symphalangism, Hereditary chondrodysplasia	Massague et al., 2000; Gordon and Blobbe, 2008
		BMP-15	Premature ovarian failure	Gordon and Blobbe, 2008
		MIS	Persistent Müllerian duct syndrome	Massague et al., 2000; Gordon and Blobbe, 2008
		NODAL	Situs Ambiguus	Gordon and Blobbe, 2008
		TGF $\beta$ -2,3	Cleft palate	Gordon and Blobbe, 2008
	Receptor	TGFBRI	Breast cancer, Loeys-dietz, Marfan and Furlong syndromes, Familial thoracic aortic aneurysm	Rooke and Crosier, 2001; ten Dijke and Arthur, 2007; Gordon and Blobbe, 2008
		BMPRII	PAH, TADD	Massague et al., 2000; Waite and Eng, 2003; ten Dijke and Arthur, 2007; Gordon and Blobbe, 2008
		TGFBRII	CML, Colorectal, Gastric, Head and Neck tumours, Small cell lung cancer and Hereditary non-polyposis colorectal cancers, Loeys-dietz, Marfan and Sphrintzen-Goldberg syndromes, B and T-cell lymphoma, Retinoblastoma, Glioma, TADD	Rooke and Crosier, 2001; Gordon and Blobbe, 2008
		BMPRI	Brachydactyly type A2, JPS, Bannayan-Riley-Ruvalcaba and Cowden syndrome, TADD	Waite and Eng, 2003 ; Gordon and Blobbe, 2008
		ALK1	HTT2	Massague et al., 2000; Waite and Eng, 2003; ten Dijke and Arthur, 2007; Gordon and Blobbe, 2008
		AMHR2	Persistent Müllerian duct syndrome	Massague et al., 2000 ; Gordon and Blobbe, 2008
	Transducer/TF	Smad4	Pancreatic, Colorectal and Ovarian cancers, JPS, HHT	Massague et al., 2000; Waite and Eng, 2003; ten Dijke and Arthur, 2007; Gordon and Blobbe, 2008
		Smad2	Colorectal cancer	Rooke and Crosier, 2001
		Smad3	CML	Rooke and Crosier, 2001

Pathway	Component		Disease	References
SWH	Receptor	Fat4	Breast cancer	Qi et al., 2009; Pan, 2010
	Transducer	MST 1/2	Soft tissue sarcoma	Seidel et al., 2007; Pan, 2010
		RASSF1	Lung and Kidney cancers	Kango-Singh and Singh, 2009
		NF2	NF2, Schwannomas	Evans et al., 2000; Jiang et al., 2006; Pan, 2010; Bao et al., 2011
		Lat 1/2	Breast tumours	Turechalk et al., 1999; Zeng and Hong, 2008
	TF	YAP TAZ	Breast, Colorectal, Hepatocellular, Lung, Ovarian, Pancreatic and Prostate carcinomas	Overholtzer et al., 2006; Zender et al., 2006; Dong et al., 2007; Steinhardt et al., 2008
Toll	Receptor	TLR1	Colon cancer Gram-positive sepsis	So and Ouchi, 2010
		TLR2	Colon, Gastric and Hepatocellular carcinomas	So and Ouchi, 2010
		TLR3	Breast, Colon and Hepatocellular carcinomas, Melanoma	So and Ouchi, 2010
		TLR4	Atherosclerosis, Arthritis, Breast, Colon, Gastric, Hepatocellular, Lung and Ovarian cancers, Carcinoma, Melanoma, Chronic inflammation	So and Ouchi, 2010; Zhu and Mohan, 2010
		TLR5	Gastric and Cervical squamous cell carcinomas	So and Ouchi, 2010
		TLR6	Hepatocellular carcinoma	So and Ouchi, 2010
		TLR7	CLL, Lupus	So and Ouchi, 2010; Zhu and Mohan, 2010
		TLR9	Breast, Cervical, Gastric, Hepatocellular and Prostate and Aquamus cell carcinomas, Glioma Diabetes type 1	So and Ouchi, 2010 ; Meyers et al. 2010
	TF	NF-KB	Diabetes type 2	Baker et al. 2011

Pathway	Component		Disease	References
Wnt	Ligand	WNT 3	Tetra-amelia	Logan and Nusse, 2004
	Receptor	LRP 5	Bone density defects, OPPG, FEVR	Logan and Nusse, 2004
		FZD 4	FEVR	Logan and Nusse, 2004
	Transducer	APC	Colon, Adeno and Basal cell carcinoma, Turcot's syndrome, FAP	Peifer and Polakis, 2000; Wechsler-Reya and Scott, 2001; Beachy et al., 2004; Logan and Nusse, 2004
		Axin	Adenocarcinoma	Beachy et al., 2004
		Axin-2	Tooth agenesis, Predisposition to Colon cancer	Logan and Nusse, 2004
		b-catenin	Adenocarcinoma	Beachy et al., 2004
	TF	TCF	Susceptibility to Diabetes type 2	Jin, 2008

Table 3. Genetic diseases associated to signalling pathways. Abbreviations: Acute lymphoblastic leukemia (ALL), Acute myeloid leukemia (AML), Chronic lymphocytic leukemia (CLL), Chronic myeloid leukemia (CML), Familial adenomatous polyposis (FAP), Familial exudative vitreoretinopathy (FEVR), Familial thoracic aortic aneurysm syndrome (TADD), Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS), Hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) or Rendu-Osler-Weber syndrome, Juvenile myelomonocytic leukaemia (JMML), Juvenile polyposis syndrome (JPS), Large granular lymphocyte leukemia (LGL), Myeloproliferative diseases (MPDs), Osteopetrosis-pseudoglioma syndrome (OPPG), Primary pulmonary arterial hypertension (PAH), Postaxial polydactyly type A (PAP-A), Pallister-Hall syndrome (PHS), Polycythemia vera (PV), Severed combined immunodeficiency (SCID).

#### 4. *Drosophila* as a model organism to analyse the genetic and cellular biology of signalling

Because of the prominent roles that signalling plays during development, and its relevance in maintaining adult homeostasis and normal physiology (see Table 3), the analysis and experimental manipulation of signalling pathways has a central role in biomedical research. In this context, a key aspect in the analysis of signalling is the use of experimental systems allowing the identification of novel components of the different pathways, the manipulation of their activity by genetic and pharmacological approaches and the understanding of the mechanisms by which they regulate cell behaviour. Not surprisingly, the organisms that most have contributed to the analysis of signalling are those allowing a robust and efficient genetic approach to unravel gene function, in particular *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*. In fact, many known components of all signalling pathway were identified in these organisms through genetic screens. The rationale of these experiments is straightforward: mutations affecting the same signalling pathway result in a similar phenotype and in general display genetic interactions. Thus, exhaustive genetic screens aimed to identify



genes regulating embryonic segmentation in flies were instrumental to identify many components of the Notch, BMP, Hh and Wnt pathways (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980), and genetic screens carried out in sensitized genetic backgrounds resulted in the identification of additional components of these pathways and also of the EGFR and InR pathways (Greaves et al., 1999; Rebay et al., 2000; Huang and Rubin, 2000; Guichard et al., 2002; Mahoney et al., 2006). More recently, mosaic screens in adult structures of the fly uncovered the SWH pathway, because of its contribution to the regulation of cell proliferation, competition and apoptosis (Cho et al., 2006; Harvey and Tapon, 2007; Tyler et al., 2007).

Signalling in *C. elegans* and *D. melanogaster* has been analysed in many different developmental settings, including the formation of the gonads (Horvitz and Sternberg, 1991), the development of the imaginal discs (Sotillos and de Celis, 2005; de Celis, 2003) and the patterning of the embryonic segments (Irish and Gelbart, 1987; Wesley, 1999), among many others. In general these studies rely in a good cellular description of the tissue and its development, the possibility of directly monitoring the domains of signalling using specific reporter assays, and the availability of sophisticated techniques to manipulate the activity of any pathway component and analyse its phenotypic consequences. We will describe in what follows and from the perspective of signalling some relevant aspects of the development of the *Drosophila* wing imaginal disc, one experimental system that has been instrumental in the analysis of cell signalling during the development of epithelial tissues.

### 5. The wing imaginal disc of *Drosophila* as a developmental model to analyse the structure, interactions and biological outcomes of signalling pathways

Imaginal discs are epithelial structures that give rise to most of the adult external structures of the fly. The wing imaginal disc starts its development as a group of about 20 embryonic ectodermal cells (Cohen et al., 1993). These cells proliferate during larval development to form the mature third instar disc, composed by approximately 50000 cells primed to differentiate during metamorphosis the fly wing and part of the thorax (Figure 3) (de Celis, 2003). Cell signalling pervades the development of the wing imaginal disc; from the initial step of primordium specification to the last stages of cellular differentiation. In this manner, the cells that constitute the wing disc primordium are determined by the combined actions of the BMP, EGFR and Wnt signalling pathways, which regulate the expression of the transcription factors specifying the group of wing disc precursor cells (Cohen et al., 1993; Goto and Hayashi, 1997). From this point onwards, the primordium enters a developmental program that involves cell division and different stages of territorial organization by which all cells acquire their individual genetic specification (Zecca and Struhl, 2002).

Territorial subdivisions in the wing disc are regulated by coordinate signalling events involving the EGFR, BMP, Notch, Hh and Wnt pathways (Figure 3). First, the wing primordium is subdivided into anterior and posterior compartments, which correspond to independent cell lineages of polyclonal origin. The posterior compartment is the source of the ligand Hh, which signalling contributes to the maintenance of the anterior-posterior compartment boundary and sets specific domains of gene expression in anterior cells from this early stage onwards (Tabata and Kornberg, 1994) (Figure 3). The subdivision into anterior-posterior compartments is followed later in development by patterning along the proximo-distal axes of the disc, a process that relies in the establishment of complementary domains of signalling by the EGFR pathway in proximal cells and by the Wnt pathway in distal cells (Zecca and Struhl, 2002). These two complementary signalling centers determine the expression of transcription factors such as Apterous, the Iroquois gene complex and Spalt in proximal cells, defining what will become the thorax of the mature wing disc (Cavodeassi et

al., 2002). The establishment of the domain of *apterous* expression also triggers the initiation of the wing region, which will appear centred along the boundary between *apterous* expressing cells, the future dorsal compartment, and *apterous* non-expressing cells, corresponding to the ventral compartment. This boundary corresponds to the future dorso-ventral compartment boundary of the wing, and is the place where Notch signalling is activated to regulate the expression of the co-factor Vestigial, which labels the primordium of the wing blade (Figure 3). The establishment of the wing blade territory as a domain of cells expressing vestigial along the dorso-ventral boundary also requires *wingless* function, which expression in distal cells is also regulated by the transcription factors defining the proximo-distal axes of the wing disc (Wu and Cohen, 2002; Whitworth and Russell, 2003; Zirin and Mann, 2007). At this stage, which corresponds to the second instar larvae, the wing disc already contains the future thorax and wing territories, and the wing is already subdivided into anterior-posterior and dorso-ventral compartments. The subsequent development of the wing disc epithelium involves the generation of the wing hinge, originated in the proximal part of the wing blade and specified by two novel rings of *wingless* expression (Perea et al., 2009), and the establishment of smaller domains of expression in both the thorax and wing regions (Figure 3).

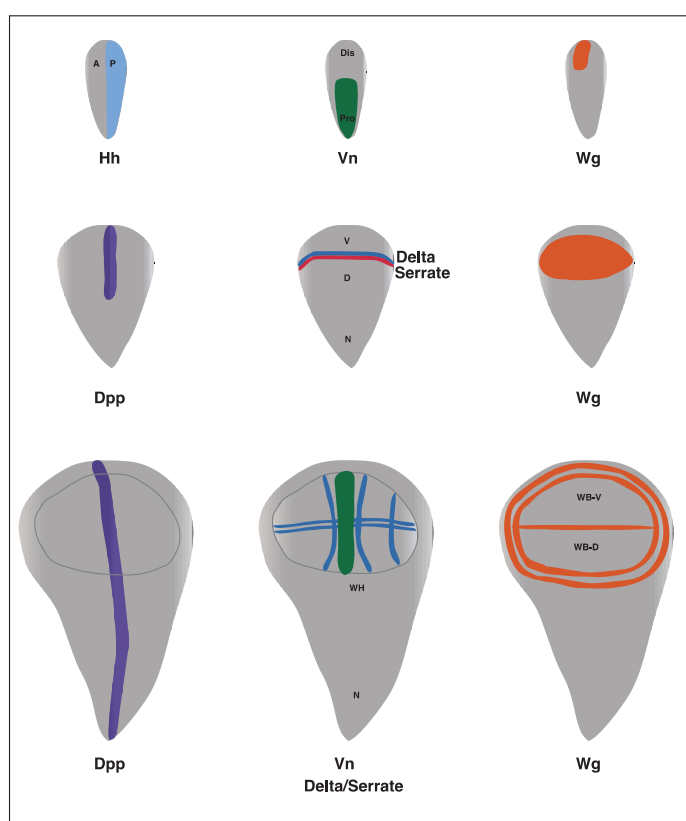


Fig. 3. Schematic representation of the wing disc during the second (upper panels), mid-third (middle panel) and late-third (bottom panel) larval instar, showing the expression of ligands in coloured stripes.

The global subdivision of the wing disc into large territories described above is followed by the regional specification of the pattern elements characteristic of the wing and thorax. These elements, the sensory organs decorating the thorax and wing margin and the longitudinal veins running along the proximo-distal length of the wing blade and hinge, differentiate from fields of competent cells, the proneural clusters and the provein territories, respectively. As it happened with the earlier territorial subdivisions, the positioning of each proneural cluster and provein territory also relies on the function of different signalling pathways, mainly the Wnt, Hh and BMP pathways for the proneural clusters and the BMP and Hh pathways for the proveins (Tomoyasu et al., 1998; Sato et al., 1999; de Celis et al., 1999; Cavodeassi et al., 2001; de Celis, 2003). These pathways now regulate the expression of several transcription factors that control the expression of the proneural and provein genes, constituting a landscape of transcriptional regulators that has been named the “pre-pattern” (Stern, 1954; Cavodeassi et al., 2001). At this stage, all patterned elements are genetically specified in the form of groups of cells with a competence to differentiate individual cell types. The last stage before cell differentiation is the assignation of cell fates within proneural clusters and provein territories. This process relies in a complex set of cell interactions mediated by the Notch and EGFR pathways and generally named “lateral inhibition”. During lateral inhibition, the EGFR pathway promotes the acquisition of the sensory organ precursor and vein fates and the Notch pathway prevents other competent cells from following these fates. In this manner, the end result is that only one cell from the proneural clusters will acquire the sensory organ precursor fate and enter a particular pattern of cell divisions (Pi and Chien, 2007). A similar process operates in the provein fields using the same two pathways, but in this case the maintenance of stripes of cells ready to differentiate as veins during pupal development also requires the activity of the BMP pathway, which ligand becomes expressed at this stage in the developing veins (de Celis, 2003).

The patterning of the disc is accompanied by a continuous increase in its size (Baker, 2007). Wing disc growth occurs mainly by cell proliferation, with cells taking about 10 hours to go through the cell cycle (González Gaitán et al., 1994; Milan et al., 1996; Neufeld et al., 1998). Several pathways such as the EGFR, Wnt, SWH, Notch and TGF $\beta$  play key roles in promoting cell division. In this manner, a reduction (EGFR, Wnt, Notch and TGF $\beta$ ) or increase (SWH) in the activity of these pathways results in the formation of smaller adult structures, and this reduction in size is caused by the generation of a lower than normal number of cells (see Figure 4). Interestingly, these effects have a strong component of territorial specificity, because the reduction of each pathway activity affects each territory of the wing disc to different extents. For example, the Wnt pathway is particularly required to promote cell proliferation in the wing hinge (Dichtel-Danjoy et al., 2009), whereas the Notch pathway is mostly required in the wing blade (de Celis and Garcia-Bellido, 1994). As mutations affecting the activity of the EGFR, Wnt, BMP and Notch pathways also affect territorial specification, the defects in cell proliferation are accompanied by changes in the general organization of the disc and its patterning. Cell division is coupled with cell growth in a manner that wing disc cells maintain a similar size during their proliferative phase. From the perspective of cellular growth, the most relevant pathway operating in the wing disc is the InR/Tor signalling system (Hietakangas and Cohen, 2009). The activity of InR/Tor is mostly required as a sensor to translate nutritional and humoral signals into

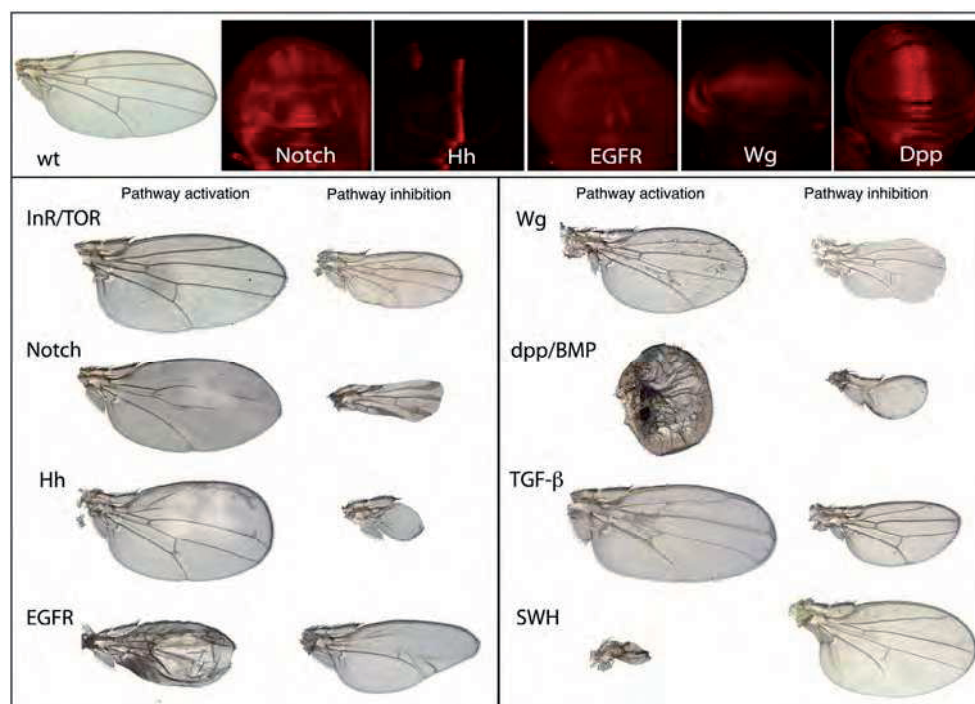


Fig. 4. Upper panel: Pictures of a wild type wing (wt, left) and third instar imaginal discs showing the domains of Notch, Hh, EGFR, Wg and Dpp signalling. Bottom panel: Pictures of mutant wings in which the activity of the InR/Tor, Notch, Hh and EGFR (left two columns), and Wg, dpp/BMP, TGF- $\beta$  and SWH (right two columns) is either increased (Pathway activation columns) or decreased (Pathway inhibition columns)

adequate rates of protein synthesis, but also provides survival signals for the cell and stimulates cell division (Hietakangas and Cohen, 2009). In general, mutations reducing InR/Tor signalling result in the formation of adult structures smaller than normal, due to both a reduction in cell size and a diminution in the number of cells (see Figure 4).

Although the wing disc is probably one of the best understood biological systems, there are still many caveats regarding the molecular mechanisms that drive cell division during the growth of the disc. Similarly, it is not entirely understood how the progress through the cell cycle is coordinated with cellular growth, and what makes the disc stop its proliferative phase when it reaches a particular size. In this manner, the molecular mechanisms ensuring the formation of patterned structures of the appropriate dimensions are still elusive. Despite of this, the current knowledge about imaginal disc development is robust enough to use this system as a model to unravel the intricacies and roles played by signalling pathways during development, and to model human diseases, using the advantages of fly genetics. There are two key aspects of the analysis of signalling in the wing disc that favours this system as an experimental model. First is the facility by which mutant phenotypes can be assigned to specific failures in particular signalling pathways. This simplifies the identification of

additional components of each signalling pathway by the phenotype caused by mutations in the corresponding genes (Figure 4), and also allows the design of genetic screens aimed to identify novel elements of the pathway. Secondly, the spatial and temporal domains of signalling can be precisely described by monitoring the expression of target genes in the disc, and this allows the visualization of receptor activity both in normal conditions and under experimental manipulations (Figure 4).

## **6. Genetic approaches to identify additional components of signalling pathways**

Some of the main reasons to choose *Drosophila* for the study of signalling are the availability of sophisticated genetic techniques to manipulate gene activity and the knowledge of the *Drosophila* genome (Adams et al., 2000; Matthews et al., 2005). First, there is a strong conservation between *Drosophila* proteins involved in signalling pathways and their human counterparts (Reiter et al., 2001; Chien et al., 2002 see Table 1). Second, *Drosophila* genes involved in signalling are generally represented in single copies, reducing the possibility of redundancy and facilitating the characterization of gene functions (Adams et al., 2000). Third, loss- and gain-of-function conditions in genes coding for signalling proteins of all pathways usually result in complementary phenotypes, allowing the assignation of genes to pathways based on mutant phenotypes (Molnar et al., 2006; Cruz et al., 2009 see Figure 4). The phenotypes observed upon hyper-activation of the pathways also allow the design of gain-of-function screens, which have the potential to uncover genes not found in loss-of-function screens due to functional redundancy (Rorth et al., 1998). Finally, mutations in different elements of each signalling pathway generally display gene-dose dependent phenotypic interactions in genetic combinations, allowing the hierarchical ordering of pathway components through genetic analysis.

There are two main ways in which genetic screens have been used to identify the components of different signalling pathways. In a first approach, newly induced mutants are tested for a phenotype in a particular structure which development depends on the normal activity of specific signalling pathways. In these cases, the mutants can be induced by chemical mutagenesis or by mobilizing transposable elements, and they can be analyzed either in homozygosity in the entire animal, or in mosaics in adult tissues using a combination of the Gal4/UAS and FRT/FLP systems. A recent example of this approach is the search for novel components of the Notch signalling pathway, in which a large collection of interference RNAs is expressed in the wing disc to systematically reduce the expression of the endogenous genes, resulting in the identification of Notch pathway candidates based on the resulting mutant phenotypes (Mummery-Widmer et al., 2009). In addition, whereas chemical mutagenesis and the expression of interference RNA result in loss of gene function, the use of transposable elements with UAS sequences allows the generation of gain-of-function conditions, which can be restricted to the tissue of interest (Rorth et al., 1998). Complementary to these approaches, the search for novel components of signalling pathways has also relied in the design of “modifier” screens, in which both loss- and gain-of-function mutants are tested in particular mutant backgrounds. In these cases, the screen aims to identify genes belonging to a pre-determined set of interacting genes. Some examples of successful screens aiming to identify members of known signalling pathways are those targeting the Sevenless and EGFR (Karim et al., 1996; Huang and Rubin, 2000; Taguchi et al., 2000; Rebay et al., 2000), Notch (Verheyen et al., 1996; Go and Artavanis-



Tsakonas, 1998; Muller et al., 2005a), Dpp (Raftery et al., 1995; Chen et al., 1998; Su et al., 2001), JAK/STAT (Bach et al., 2003; Mukherjee et al., 2006), Hh (Haines and van den Heuvel, 2000; Collins and Cohen, 2005), TNF (Geuking et al., 2005) and Wnt (Greaves et al., 1999; Cox et al., 2000; Desbordes et al., 2005) pathways.

Although the use of genetic screens *in vivo* has many advantages, they are time-consuming and difficult to escalate genome-wide. For these reasons, and based on the knowledge of the *Drosophila* genome, several techniques using *Drosophila* cells in culture and interference RNA have been adopted in the search for novel signalling components. These screens allow the identification of genes affecting the expression of reporter constructs that reveal the activity of specific signalling pathways (Clemens et al., 2000; Flockhart et al., 2006). This approach has been used to search for novel components of the Hh (Lum et al., 2003; Nybakken et al., 2005), and of the Wnt (DasGupta et al., 2005), JAK/Stat (Muller et al., 2005b), TNF (Kleino et al., 2005), Tor (Lindquist et al., 2011) and ERK (Friedman and Perrimon, 2006) signalling pathways.

## 7. *Drosophila* models of genetic diseases

It is clear that the main advantage of the *Drosophila* model from a biomedical perspective is the possibility of designing genetic screens aimed to the identification of genes involved in a particular phenotypic outcome. In this context, it is worth noticing that an estimated 60% of genes related to human diseases have orthologs in *Drosophila*, and this category includes all genes involved in cell signalling (Chien et al., 2002; Reiter et al., 2001). The possibility of generating transgenic flies expressing modified non-*Drosophila* proteins is allowing the design of “humanized” fly models for a variety of human genetic diseases such as Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 (Read et al., 2005), cardiomyopathies (Vu Manh et al., 2005) and Adenomatous Polyposis Coli (APC; Bhandari and Shashidhara, 2001) and several neurodegenerative diseases (Fernandez-Funez et al., 2000; Crowther et al., 2004; Sang and Jackson, 2005; Botas, 2007; Branco et al., 2008; Cukier et al., 2008; Miller et al., 2010). The aim of these experiments is to recreate in a fly tissue some of the cellular aspects of the pathology caused by the human protein, and to use this genetic background as a platform to search for genes affecting the phenotype caused by the miss-expression of this protein (Botas, 2007). In the long term, it is expected that the identification of additional genes involved in a particular phenotypic outcome will allow the search for chemotherapeutic agents with therapeutical value. In addition to genetic searches, *Drosophila* also permits to recapitulate the biology of particular diseases *in vivo* systems, an approach that is been applied to the study of tumorigenesis using among other tissues the imaginal discs (Janic et al., 2010). In this manner *Drosophila* tissues can be used not only to track down the steps leading to tumour initiation, progression and metastasis *in vivo*, but also to manipulate in genetic mosaics the activity of genes leading to tumoral growth and to assay therapeutic drugs (Kango-Singh and Halder, 2004; Vidal and Cagan, 2006; Jang et al., 2007; Januschke and Gonzalez, 2008; Read et al., 2009; Caldeira et al., 2009; Das and Cagan, 2010; Bina et al., 2010; Wu et al., 2010). This approach is contributing to dissect the effects of tumour-promoting and tumour-suppressing genes in the regulation of proliferation, apoptosis, cell-adhesion, trafficking and cell polarity, and revealed the importance of cellular interactions in the outcome of tumoral progression. Finally, the modelling of specific cancers, such as type 2 multiple endocrine neoplasia (MEN2, caused by hyper-activation of RET; Read et al., 2005b) has allowed the design and use of pharmacological approaches to modify the phenotype

caused by oncogenic forms of dRET (Das and Cagan, 2010). In addition, a similar approach prove successful in interfering with the activation of the EGFR (Aritakula and Ramasamy, 2008), suggesting that *Drosophila* has also the potential to be a robust model system for the screening of anticancer drugs in vivo.

## 8. Acknowledgements

We are very grateful to Ana Ruiz-Gómez and Antonio Baonza for criticism that greatly improved the manuscript. Work in our laboratory is funded by Grants BFU2009-09403 and CSD2007-00008 and by an institutional grant from Fundación Ramón Areces to the Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. We apologize to all scientists whose contributions were not referenced in this review because of space limitations.

## 9. References

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185-95.
- Akimaru, H., Chen, Y., Dai, P., Hou, D. X., Nonaka, M., Smolik, S. M., Armstrong, S., Goodman, R. H. and Ishii, S. (1997a). *Drosophila* CBP is a co-activator of cubitus interruptus in hedgehog signalling. *Nature* 386, 735-8.
- Akimaru, H., Hou, D. X. and Ishii, S. (1997b). *Drosophila* CBP is required for dorsal-dependent twist gene expression. *Nat Genet* 17, 211-4.
- Angers, S. and Moon, R. T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 468-77.
- Aoki, Y., Nihori, T., Kawame, H., Kurosawa, K., Ohashi, H., Tanaka, Y., Filocamo, M., Kato, K., Suzuki, Y., Kure, S. et al. (2005). Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 37, 1038-40.
- Araujo, H., Negreiros, E. and Bier, E. (2003). Integrins modulate Sog activity in the *Drosophila* wing. *Development* 130, 3851-64.
- Arbouzova, N. I. and Zeidler, M. P. (2006). JAK/STAT signalling in *Drosophila*: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* 133, 2605-16.
- Aritakula, A. and Ramasamy, A. (2008). *Drosophila*-based in vivo assay for the validation of inhibitors of the epidermal growth factor receptor/Ras pathway. *J. Biosci.* 33, 731-742.
- Arnold, S. J. and Robertson, E. J. (2009). Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 91-103.
- Arnone, M. I. and Davidson, E. H. (1997). The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* 124, 1851-64.
- Avraham, R. and Yarden, Y. (2011). Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 104-17.
- Axelrod, J. D. (2010). Delivering the lateral inhibition punchline: it's all about the timing. *Sci Signal* 3, pe38.
- Bach, E. A., Vincent, S., Zeidler, M. P. and Perrimon, N. (2003). A Sensitized Genetic Screen to Identify Novel Regulators and Components of the *Drosophila* Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway. *Genetics* 165, 1149-1166.



- Bachmann, A. and Knust, E. (1998). Dissection of cis-regulatory elements of the *Drosophila* gene *Serrate*. *Dev. Genes Evol.* 208, 346-351.
- Baeg, G.-H., Lin, X., Khare, N., Baumgartner, S. and Perrimon, N. (2001). Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of *Wingless*. *Development* 128, 87-94.
- Baker, N. E. (2007). Patterning signals and proliferation in *Drosophila* imaginal discs. *Curr Opin Genet Dev* 17, 287-93.
- Baker, R. G., Hayden, M. S. and Ghosh, S. (2011). NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 13, 11-22.
- Baonza, A., Murawsky, C. M., Travers, A. A. and Freeman, M. (2002). Pointed and *Tramtrack69* establish an EGFR-dependent transcriptional switch to regulate mitosis. *Nat Cell Biol* 4, 976-980.
- Bartscherer, K. and Boutros, M. (2008). Regulation of Wnt protein secretion and its role in gradient formation. *EMBO Rep* 9, 977-82.
- Bao, Y., Hata, Y., Ikeda, M. and Withanage, K. (2011). Mammalian Hippo pathway: from development to cancer and beyond. *J Biochem* 149, 361-79.
- Barker, N., Hurlstone, A., Musisi, H., Miles, A., Bienz, M. and Clevers, H. (2001). The chromatin remodelling factor Brg-1 interacts with beta-catenin to promote target gene activation. *EMBO J* 20, 4935-43.
- Barrio, R., Lopez-Varea, A., Casado, M. and de Celis, J. F. (2007). Characterization of dSnoN and its relationship to Decapentaplegic signalling in *Drosophila*. *Dev Biol* 306, 66-81.
- Beachy, P. A., Karhadkar, S. S. and Berman, D. M. (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 432, 324-31.
- Bentires-Alj, M., Kontaridis, M. I. and Neel, B. G. (2006). Stops along the RAS pathway in human genetic disease. *Nat Med* 12, 283-5.
- Bernard, F., Krejci, A., Housden, B., Adryan, B. and Bray, S. J. (2010). Specificity of Notch pathway activation: twist controls the transcriptional output in adult muscle progenitors. *Development* 137, 2633-42.
- Bethani, I., Skanland, S. S., Dikic, I. and Acker-Palmer, A. (2010). Spatial organization of transmembrane receptor signalling. *EMBO J* 29, 2677-88.
- Bhandari, P. and Shashidhara, L. S. (2001). Studies on human colon cancer gene APC by targeted expression in *Drosophila*. *Oncogene* 20, 6871-80.
- Bina, S., Wright, V. M., Fisher, K. H., Milo, M. and Zeidler, M. P. (2010). Transcriptional targets of *Drosophila* JAK/STAT pathway signalling as effectors of haematopoietic tumour formation. *EMBO Rep* 11, 201-7.
- Blair, E., Redwood, C., Ashrafian, H., Oliveira, M., Broxholme, J., Kerr, B., Salmon, A., Ostman-Smith, I. and Watkins, H. (2001). Mutations in the gamma(2) subunit of AMP-activated protein kinase cause familial hypertrophic cardiomyopathy: evidence for the central role of energy compromise in disease pathogenesis. *Hum Mol Genet* 10, 1215-20.
- Bonn, S. and Furlong, E. E. (2008). cis-Regulatory networks during development: a view of *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 18, 513-20.
- Bos, J. L. (1989). ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-9.
- Botas, J. (2007). *Drosophila* researchers focus on human disease. *Nat Genet* 39, 589-91.

- Branco, J., Al-Ramahi, I., Ukani, L., Perez, A. M., Fernandez-Funez, P., Rincon-Limas, D. and Botas, J. (2008). Comparative analysis of genetic modifiers in *Drosophila* points to common and distinct mechanisms of pathogenesis among polyglutamine diseases. *Hum Mol Genet* 17, 376-90.
- Bray, S. J. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 678-89.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R. and Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* 11, 213-21.
- Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 109, 1139-42.
- Caldeira, J., Pereira, P. S., Suriano, G. and Casares, F. (2009). Using fruitflies to help understand the molecular mechanisms of human hereditary diffuse gastric cancer. *Int J Dev Biol* 53, 1557-61.
- Campisi, J. and d'Adda, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 729-740.
- Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F. and Michelson, A. M. (1998). Combinatorial signalling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev* 12, 3910-22.
- Carbone, D. P. (2000). Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 92, 1355-7.
- Cavodeassi, F., Modolell, J. and Gomez-Skarmeta, J. L. (2001). The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning. *Development* 128, 2847-55.
- Cavodeassi, F., Rodriguez, I. and Modolell, J. (2002). Dpp signalling is a key effector of the wing-body wall subdivision of the *Drosophila* mesothorax. *Development* 129, 3815-3823.
- Chen, Y., Riese, M. J., Killinger, M. A. and Hoffmann, F. M. (1998). A genetic screen for modifiers of *Drosophila* decapentaplegic signalling identifies mutations in punt, Mothers against dpp and the BMP-7 homologue, 60A. *Development* 125, 1759-1768.
- Chen, Y., Goodman, R. H. and Smolik, S. M. (2000). Cubitus interruptus requires *Drosophila* CREB-binding protein to activate wingless expression in the *Drosophila* embryo. *Mol Cell Biol* 20, 1616-25.
- Chen, Y. and Struhl, G. (1996). Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87, 553-563.
- Chien, S., Reiter, L. T., Bier, E. and Gribskov, M. (2002). Homophila: human disease gene cognates in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 30, 149-51.
- Chien, A. J., Conrad, W. H. and Moon, R. T. (2009). A Wnt survival guide: from flies to human disease. *J Invest Dermatol* 129, 1614-27.
- Cho, E., Feng, Y., Rauskolb, C., Maitra, S., Fehon, R. and Irvine, K. D. (2006). Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nat Genet* 38, 1142-50.
- Chopra, V. S. and Levine, M. (2009). Combinatorial patterning mechanisms in the *Drosophila* embryo. *Brief Funct Genomic Proteomic* 8, 243-9.
- Clemens, J. C., Worby, C. A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B. A. and Dixon, J. E. (2000). Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *P.N.A.S.* 97, 6499-6503.
- Cohen, B., Simcox, A. A. and Cohen, S. M. (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* 117, 397-608.

- Collins, R. T. and Cohen, S. M. (2005). A Genetic Screen in *Drosophila* for Identifying Novel Components of the Hedgehog Signalling Pathway. *Genetics* 170, 173-184.
- Constantinescu, S. N., Girardot, M. and Pecquet, C. (2008). Mining for JAK-STAT mutations in cancer. *Trends Biochem Sci* 33, 122-31.
- Cox, R. T., McEwen, D. G., Myster, D. L., Duronio, R. J., Loureiro, J. and Peifer, M. (2000). A screen for mutations that suppress the phenotype of *Drosophila* armadillo, the beta-catenin homolog. *Genetics* 155, 1725-40.
- Crowther, D. C., Kinghorn, K. J., Page, R. and Lomas, D. A. (2004). Therapeutic targets from a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Curr Opin Pharmacol* 4, 513-6.
- Cruz, C., Glavic, A., Casado, M. and de Celis, J. F. (2009). A gain-of-function screen identifying genes required for growth and pattern formation of the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics* 183, 1005-26.
- Cukier, H. N., Perez, A. M., Collins, A. L., Zhou, Z., Zoghbi, H. Y. and Botas, J. (2008). Genetic modifiers of MeCP2 function in *Drosophila*. *PLoS Genet* 4, e1000179.
- Dai, H., Hogan, C., Gopalakrishnan, B., Torres-Vazquez, J., Nguyen, M., Park, S., Raftery, L. A., Warrior, R. and Arora, K. (2000). The zinc finger protein schnurri acts as a Smad partner in mediating the transcriptional response to decapentaplegic. *Dev Biol* 227, 373-87.
- Dang, T. P., Gazdar, A. F., Virmani, A. K., Sepetavec, T., Hande, K. R., Minna, J. D., Roberts, J. R.,
- Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F., Anders, R. A., Maitra, A. and Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 130, 1120-33.
- Das, T. and Cagan, R. (2010). *Drosophila* as a novel therapeutic discovery tool for thyroid cancer. *Thyroid* 20, 689-95.
- DasGupta, R., Kaykas, A., Moon, R. T. and Perrimon, N. (2005). Functional genomic analysis of the Wnt-wingless signalling pathway. *Science* 308, 826-33.
- de Celis, J. F. (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: the development of the veins. *BioEssays* 25, 443-451.
- de Celis, J. F., Barrio, R. and Kafatos, F. C. (1999). Regulation of the spalt/spalt-related gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development* 126, 2653-2662.
- de Celis, J. F. and Garcia-Bellido, A. (1994). Roles of the Notch gene in *Drosophila* wing morphogenesis. *Mech. Dev.*, 109-122.
- Desbordes, S. C., Chandraratna, D. and Sanson, B. (2005). A Screen for Genes Regulating the Wingless Gradient in *Drosophila* Embryos. *Genetics* 170, 749-766.
- Dichtel-Danjoy, M. L., Caldeira, J. and Casares, F. (2009). SoxF is part of a novel negative-feedback loop in the wingless pathway that controls proliferation in the *Drosophila* wing disc. *Development* 136, 761-9.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 11-22.
- Duboc, V. and Logan, M. P. (2009). Building limb morphology through integration of signalling modules. *Curr Opin Genet Dev* 19, 497-503.
- Dubnicoff, T., Valentine, S. A., Chen, G., Shi, T., Lengyel, J. A., Paroush, Z. and Courey, A. J. (1997). Conversion of dorsal from an activator to a repressor by the global corepressor Groucho. *Genes Dev* 11, 2952-7.

- Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D. and Sklar, J. (1991). TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell* 66, 649-61.
- Evans, D. G., Sainio, M. and Baser, M. E. (2000). Neurofibromatosis type 2. *J Med Genet* 37, 897-904.
- Feng, X. H., Zhang, Y., Wu, R. Y. and Derynck, R. (1998). The tumor suppressor Smad4/DPC4 and transcriptional adaptor CBP/p300 are coactivators for smad3 in TGF-beta-induced transcriptional activation. *Genes Dev* 12, 2153-63.
- Fernandez, B. G., Arias, A. M. and Jacinto, A. (2007). Dpp signalling orchestrates dorsal closure by regulating cell shape changes both in the amnioserosa and in the epidermis. *Mech Dev* 124, 884-97.
- Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M. L., de Gouyon, B., She, W. C., Luchak, J. M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P. J. et al. (2000). Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* 408, 101-6.
- Flockhart, I., Booker, M., Kiger, A., Boutros, M., Armknecht, S., Ramadan, N., Richardson, C., Xu, T., Perrimon, N. and Mathey-Prevot, B. (2006). FlyRNAi: the *Drosophila* RNAi screening center database *Nucleic Acids Research* 34, 489-494.
- Friedman, A. and Perrimon, N. (2006). A functional RNAi screen for regulators of receptor tyrosine kinase and ERK signalling. *Nature* 444, 230-4.
- Funakoshi, Y., Minami, M. and Tabata, T. (2001). *mtv* shapes the activity gradient of the Dpp morphogen through regulation of thickveins. *Development* 128, 67-74.
- Gerondakis, S., Grumont, R., Gugasyan, R., Wong, L., Isomura, I., Ho, W. and Banerjee, A. (2006). Unravelling the complexities of the NF-kappaB signalling pathway using mouse knockout and transgenic models. *Oncogene* 25, 6781-99.
- Geuking, P., Narasimamurthy, R. and Basler, K. (2005). A Genetic Screen Targeting the Tumor Necrosis Factor/Eiger Signalling Pathway: Identification of *Drosophila* TAB2 as a Functionally Conserved Component. *Genetics* 171, 1683-1694.
- Gilbert, M. M., Beam, C. K., Robinson, B. S. and Moberg, K. H. (2009). Genetic interactions between the *Drosophila* tumor suppressor gene *ept* and the *stat92E* transcription factor. *PLoS One* 4, e7083.
- Go, M. J. and Artavanis-Tsakonas, S. (1998). A genetic screen for novel components of the Notch signalling pathway during *Drosophila* bristle development. *Genetics* 150, 211-220.
- González Gaitán, M., Capdevila, M. P. and García Bellido, A. (1994). Cell proliferation patterns in the wing imaginal disc of *Drosophila*. *Mech. Dev.* 46, 183-200.
- Gordon, K. J. and Blobel, G. C. (2008). Role of transforming growth factor-beta superfamily signalling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1782, 197-228.
- Goto, S. and Hayashi, S. (1997). Specification of the embryonic limb primordium by graded activity of Decapentaplegic. *Development* 124, 125-132.
- Greaves, S., Sanson, B., White, P. and Vincent, J. P. (1999). A screen for identifying genes interacting with armadillo, the *Drosophila* homolog of beta-catenin. *Genetics* 153, 1753-66.
- Greer, E. L. and Brunet, A. (2008). FOXO transcription factors in ageing and cancer. *Acta Physiol (Oxf)* 192, 19-28.

- Grusche, F. A., Richardson, H. E. and Harvey, K. F. (2010). Upstream regulation of the hippo size control pathway. *Curr Biol* 20, R574-82.
- Guichard, A., Srinivasan, S., Zimm, G. and Bier, E. (2002). A screen for dominant mutations applied to components in the Drosophila EGF-R pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3752-7.
- Haber, D. A. (2006). Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12405-10.
- Haenlin, M., Kramatschek, B. and Campos-Ortega, J. A. (1990). The pattern of transcription of the neurogenic gene Delta of Drosophila melanogaster. *Development* 110, 905-914.
- Haenlin, M., Kunisch, M., Kramatschek, B. and Campos-Ortega, J. A. (1994). Genomic regions regulating early embryonic expression of the Drosophila neurogenic gene Delta. *Mech. Dev.* 47, 99-110.
- Haines, N. and van den Heuvel, M. (2000). A Directed Mutagenesis Screen in Drosophila melanogaster Reveals New Mutants That Influence hedgehog Signalling. *Genetics* 156, 1777-1785.
- Halder, G. and Johnson, R. L. (2011). Hippo signalling: growth control and beyond. *Development* 138, 9-22.
- Harper, J. A., Yuan, J. S., Tan, J. B., Visan, I. and Guidos, C. J. (2003). Notch signalling in development and disease. *Clin Genet* 64, 461-72.
- Harvey, K. and Tapon, N. (2007). The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer* 7, 182-91.
- Hasson, P. and Paroush, Z. (2007). Crosstalk between the EGFR and other signalling pathways at the level of the global transcriptional corepressor Groucho/TLE. *Br J Cancer* 96 Suppl, R21-5.
- Hernan, I., Roig, I., Martin, B., Gamundi, M. J., Martinez-Gimeno, M. and Carballo, M. (2004). De novo germline mutation in the serine-threonine kinase STK11/LKB1 gene associated with Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Genet* 66, 58-62.
- Hietakangas, V. and Cohen, S. M. (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet* 43, 389-410.
- Hoeller, D., Volarevic, S. and Dikic, I. (2005). Compartmentalization of growth factor receptor signalling. *Curr Opin Cell Biol* 17, 107-11.
- Hoffmans, R. and Basler, K. (2004). Identification and in vivo role of the Armadillo-Legless interaction. *Development* 131, 4393-400.
- Hombria, J. C. and Sotillos, S. (2008). Disclosing JAK/STAT links to cell adhesion and cell polarity. *Semin Cell Dev Biol* 19, 370-8.
- Horvitz, H. R. and Sternberg, P. W. (1991). Multiple intercellular signalling systems control the development of the Caenorhabditis elegans vulva. *Nature* 351, 535-541.
- Hou, S. X., Zheng, Z., Chen, X. and Perrimon, N. (2002). The Jak/STAT pathway in model organisms: emerging roles in cell movement. *Dev Cell* 3, 765-78.
- Huang, A. M. and Rubin, G. M. (2000). A Misexpression Screen Identifies Genes That Can Modulate RAS1 Pathway Signalling in Drosophila melanogaster. *Genetics* 156, 1219-1230.
- Igaki, T. (2009). Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from Drosophila JNK signalling. *Apoptosis* 14, 1021-8.
- Inoki, K., Corradetti, M. N. and Guan, K. L. (2005). Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 37, 19-24.



- Irish, V. F. and Gelbart, W. M. (1987). The decapentaplegic gene is required for dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 1, 868-79.
- Jackson, S. M., Nakato, H., Sugiura, M., Jannuzzi, A., Oakes, R., Kaluza, V., Golden, C. and Selleck, S. B. (1997). dally, a *Drosophila* glypican, controls cellular responses to the TGF-beta-related morphogen, Dpp. *Development* 124, 4113-4120.
- Jacob, L. and Lum, L. (2007). Deconstructing the hedgehog pathway in development and disease. *Science* 318, 66-8.
- Jacobs, C. I. (2008). A review of the role of insulin-like growth factor 2 in malignancy and its potential as a modifier of radiation sensitivity. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 20, 345-52.
- Jang, A. C., Starz-Gaiano, M. and Montell, D. J. (2007). Modeling migration and metastasis in *Drosophila*. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12, 103-14.
- Janic, A., Mendizabal, L., Llamazares, S., Rossell, D. and Gonzalez, C. (2010). Ectopic expression of germline genes drives malignant brain tumor growth in *Drosophila*. *Science* 330, 1824-7.
- Janknecht, R., Wells, N. J. and Hunter, T. (1998). TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev* 12, 2114-9.
- Januschke, J. and Gonzalez, C. (2008). *Drosophila* asymmetric division, polarity and cancer. *Oncogene* 27, 6994-7002.
- Jiang, Z., Li, X., Hu, J., Zhou, W., Jiang, Y., Li, G. and Lu, D. (2006). Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of LATS1 and LATS2 in human astrocytoma. *Neurosci Res* 56, 450-8.
- Jin, T. (2008). The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia* 51, 1771-80.
- Jones, S. M. and Kazlauskas, A. (2001). Growth factor-dependent signalling and cell cycle progression. *Chem Rev* 101, 2413-23.
- Kango-Singh, M. and Halder, G. (2004). *Drosophila* as an emerging model to study metastasis. *Genome Biol* 5, 216.
- Kango-Singh, M. and Singh, A. (2009). Regulation of organ size: insights from the *Drosophila* Hippo signalling pathway. *Dev Dyn* 238, 1627-37.
- Karim, F. D., Chang, H. C., Therrien, M., Wassarman, D. A., Lavery, T. and Rubin, G. M. (1996). A Screen for Genes That Function Downstream of Ras1 During *Drosophila* Eye Development. *Genetics* 143, 315-329.
- Kataoka, H. (2009). EGFR ligands and their signalling scissors, ADAMs, as new molecular targets for anticancer treatments. *J Dermatol Sci* 56, 148-53.
- Kim, N. C. and Marques, G. (2010). Identification of downstream targets of the bone morphogenetic protein pathway in the *Drosophila* nervous system. *Dev Dyn* 239, 2413-25.
- Kim, E. K. and Choi, E. J. Pathological roles of MAPK signalling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802, 396-405.
- Kimelman, D. (2006). Mesoderm induction: from caps to chips. *Nat Rev Genet* 7, 360-72.
- Kleino, A., Valanne, S., Ulvila, J., Kallio, J., Myllymaki, H., Enwald, H., Stoven, S., Poidevin, M., Ueda, R., Hultmark, D. et al. (2005). Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway. *EMBO J* 24, 3423-34.
- Kuan, C. T., Wikstrand, C. J. and Bigner, D. D. (2001). EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8, 83-96.
- Kumar, J. P. (2001). Signalling pathways in *Drosophila* and vertebrate retinal development. *Nat Rev Genet* 2, 846-57.

- Lage, P., Jan, Y. N. and Jarman, A. P. (1997). Requirement for EGF receptor signalling in neural recruitment during formation of Drosophila chordotonal sense organ clusters. *Curr Biol* 7, 166-75.
- Le Bras, S., Loyer, N. and Le Borgne, R. (2011). The multiple facets of ubiquitination in the regulation of notch signalling pathway. *Traffic* 12, 149-61.
- Lecuit, T. and Cohen, S. M. (1998). Dpp receptor levels contribute to shaping the Dpp morphogen gradient in the Drosophila wing imaginal disc. *Development* 125, 4901-7.
- Lindquist, R., Ottina, K., Wheeler1, D., Hsu, P., Thoreen, C., Guertin, D., Ali, S., Sengupta, S., Shaul, Y., Lamprecht, M. et al. (2011). Genome-scale RNAi on living-cell microarrays identifies novel regulators of Drosophila melanogaster TORC1-S6K pathway signalling *Genome Res.* 21, 433-446.
- Logan, C. Y. and Nusse, R. (2004). The Wnt signalling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.
- Luo, K., Stroschein, S. L., Wang, W., Chen, D., Martens, E., Zhou, S. and Zhou, Q. (1999). The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGFbeta signalling. *Genes Dev* 13, 2196-206.
- Lum, L., Yao, S., Mozer, B., Rovescalli, A., Von Kessler, D., Nirenberg, M. and Beachy, P. A. (2003). Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in Drosophila cultured cells. *Science* 299, 2039-45.
- Lupo, G., Harris, W. A. and Lewis, K. E. (2006). Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 7, 103-14.
- Ma, X. M. and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 307-18.
- Mahoney, M. B., Parks, A. L., Ruddy, D. A., Tiong, S. Y. K., Esengil, H., Phan, A. C., Philandrinis, P., Winter, C. G., Chatterjee, R., Huppert, K. et al. (2006). Presenilin-Based Genetic Screens in Drosophila melanogaster Identify Novel Notch Pathway Modifiers. *Genetics* 172, 2309-2324.
- Massague, J., Blain, S. W. and Lo, R. S. (2000). TGFbeta signalling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 103, 295-309.
- Massague, J. and Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signalling system. *EMBO J* 19, 1745-54.
- Matallanas, D., Romano, D., Hamilton, G., Kolch, W. and O'Neill, E. (2008). A Hippo in the ointment: MST signalling beyond the fly. *Cell Cycle* 7, 879-84.
- Matthews, K. A., Kaufman, T. C. and Gelbart, W. M. (2005). Research resources for Drosophila: the expanding universe. *Nat Rev Genet* 6, 179-93.
- Mendelsohn, J. and Baselga, J. (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* 19, 6550-65.
- Meyers, A. J., Shah, R. R., Gottlieb, P. A. and Zipris, D. (2010). Altered Toll-like receptor signalling pathways in human type 1 diabetes. *J Mol Med* 88, 1221-31.
- McNeill, H. and Woodgett, J. R. (2010). When pathways collide: collaboration and connivance among signalling proteins in development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 404-13.
- Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A. (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of Drosophila. *P.N.A.S.* 93, 640-645.



- Miller, J. P., Holcomb, J., Al-Ramahi, I., de Haro, M., Gafni, J., Zhang, N., Kim, E., Sanhueza, M., Torcassi, C., Kwak, S. et al. (2010). Matrix metalloproteinases are modifiers of huntingtin proteolysis and toxicity in Huntington's disease. *Neuron* 67, 199-212.
- Mills, I. G. (2007). The interplay between clathrin-coated vesicles and cell signalling. *Semin Cell Dev Biol* 18, 459-70.
- Miura, G. I., Buglino, J., Alvarado, D., Lemmon, M. A., Resh, M. D. and Treisman, J. E. (2006). Palmitoylation of the EGFR ligand Spitz by Rasp increases Spitz activity by restricting its diffusion. *Dev Cell* 10, 167-76.
- Miyazono, K., Kamiya, Y. and Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem* 147, 35-51.
- Miyazono, K., Maeda, S. and Imamura, T. (2005). BMP receptor signalling: transcriptional targets, regulation of signals, and signalling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 251-63.
- Mok, G. F. and Sweetman, D. (2011). Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle development. *Reproduction* 141, 301-12.
- Molnar, C., Lopez-Varea, A., Hernandez, R. and de Celis, J. F. (2006). A gain-of-function screen identifying genes required for vein formation in the *Drosophila melanogaster* wing. *Genetics* 174, 1635-59.
- Moussian, B. and Roth, S. (2005). Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo--shaping and transducing a morphogen gradient. *Curr Biol* 15, R887-99.
- Mukherjee, T., Schafer, U. and Zeidler, M. P. (2006). Identification of *Drosophila* Genes Modulating Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription Signal Transduction. *Genetics* 172, 1683-1697.
- Muller, D., Kugler, S. J., Preiss, A., Maier, D. and Nagel, A. C. (2005a). Genetic Modifier Screens on Hairless Gain-of-Function Phenotypes Reveal Genes Involved in Cell Differentiation, Cell Growth and Apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 171, 1137-1152.
- Muller, P., Kutenkeuler, D., Gesellchen, V., Zeidler, M. P. and Boutros, M. (2005b). Identification of JAK/STAT signalling components by genome-wide RNA interference. *Nature* 436, 871-5.
- Mummery-Widmer, J. L., Yamazaki, M., Stoeger, T., Novatchkova, M., Bhalerao, S., Chen, D., Dietzl, G., Dickson, B. J. and Knoblich, J. A. (2009). Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature* 458, 987-92.
- Neufeld, T., de la Cruz, A., Johnston, L. and Edgar, B. (1998). Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* 93, 1183-1193.
- Nusse, R. (1999). WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet* 15, 1-3.
- Nusslein-Volhard, C. and Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.
- Nybakken, K., Vokes, S. A., Lin, T. Y., McMahon, A. P. and Perrimon, N. (2005). A genome-wide RNA interference screen in *Drosophila melanogaster* cells for new components of the Hh signalling pathway. *Nat Genet* 37, 1323-32.
- O'Neill, L. A. (2003). Therapeutic targeting of Toll-like receptors for inflammatory and infectious diseases. *Curr Opin Pharmacol* 3, 396-403.
- O'Sullivan, L. A., Liongue, C., Lewis, R. S., Stephenson, S. E. and Ward, A. C. (2007). Cytokine receptor signalling through the Jak-Stat-Socs pathway in disease. *Mol Immunol* 44, 2497-506.

- Overholtzer, M., Zhang, J., Smolen, G. A., Muir, B., Li, W., Sgroi, D. C., Deng, C. X., Brugge, J. S. and Pan, D. (2010). The hippo signalling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 19, 491-505.
- Pajni-Underwood, S., Wilson, C. P., Elder, C., Mishina, Y. and Lewandoski, M. (2007). BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signalling. *Development* 134, 2359-2368.
- Parks, A. L., Turner, F. R. and Muskavitch, M. A. T. (1995). Relationships between complex Delta expression and the specification of retinal cell fates during Drosophila eye development. *Mech. Dev.* 50, 201-216.
- Peacock, C. D., Wang, Q., Gesell, G. S., Corcoran-Schwartz, I. M., Jones, E., Kim, J., Devereux, W. L., Peifer, M. and Pham, A. D., Muller, S. and Sauer, F. (1999). Mesoderm-determining transcription in Drosophila is alleviated by mutations in TAF(II)60 and TAF(II)110. *Mech Dev* 84, 3-16.
- Perea, D., Terriente, J. and Diaz-Benjumea, F. J. (2009). Temporal and spatial windows delimit activation of the outer ring of wingless in the Drosophila wing. *Dev Biol* 328, 445-55.
- Perrimon, N. and McMahon, A. P. (1999). Negative feedback mechanisms and their roles during pattern formation. *Cell* 97, 13-16.
- Petcherski, A. G. and Kimble, J. (2000). Mastermind is a putative activator for Notch. *Curr Biol* 10, R471-3.
- Pfeifer, A. C., Timmer, J. and Klingmuller, U. (2008). Systems biology of JAK/STAT signalling. *Essays Biochem* 45, 109-20.
- Pfeiffer, S. and Vincent, J. P. (1999). Signalling at a distance: transport of Wingless in the embryonic epidermis of Drosophila. *Semin Cell Dev Biol* 10, 303-9.
- Pi, H. and Chien, C. T. (2007). Getting the edge: neural precursor selection. *J Biomed Sci* 14, 467-73.
- Piddini, E. and Vincent, J. P. (2003). Modulation of developmental signals by endocytosis: different means and many ends. *Curr Opin Cell Biol* 15, 474-81.
- Polakis, P. (2000). Wnt signalling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science* 287, 1606-9.
- Pouponnot, C., Jayaraman, L. and Massague, J. (1998). Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J Biol Chem* 273, 22865-8.
- Qi, C., Zhu, Y. T., Hu, L. and Zhu, Y. J. (2009). Identification of Fat4 as a candidate tumor suppressor gene in breast cancers. *Int J Cancer* 124, 793-8.
- Raftery, L. A., Twombly, V., Wharton, K. and Gelbart, W. M. (1995). Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signalling pathway in Drosophila. *Genetics* 139, 241-54.
- Raftery, L. A. and Sutherland, D. J. (1999). TGF-beta family signal transduction in Drosophila development: from Mad to Smads. *Dev Biol* 210, 251-68.
- Rane, S. G. and Reddy, E. P. (2000). Janus kinases: components of multiple signalling pathways. *Oncogene* 19, 5662-79.
- Read, R. D., Cavenee, W. K., Furnari, F. B. and Thomas, J. B. (2009). A drosophila model for EGFR-Ras and PI3K-dependent human glioma. *PLoS Genet* 5, e1000374.
- Read, R. D., Goodfellow, P. J., Mardis, E. R., Novak, N., Armstrong, J. R. and Cagan, R. L. (2005a). A Drosophila Model of Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *Genetics* 171, 1057-1081.

- Rebay, I., Chen, F., Hsiao, F., Kolodziej, P. A., Kuang, B. H., Lavery, T., Suh, C., Voas, M., Williams, A. and Rubin, G. M. (2000). A Genetic Screen for Novel Components of the Ras/Mitogen-Activated Protein Kinase Signalling Pathway That Interact With the yan Gene of *Drosophila* Identifies split ends, a New RNA Recognition Motif-Containing Protein. *Genetics* 154, 695-712.
- Reiter, L. T., Potocki, L., Chien, S., Gribskov, M. and Bier, E. (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11, 1114-25.
- Resnick, L. and Fennell, M. (2004). Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders. *Drug Discov Today* 9, 932-9.
- Resnik-Docampo, M. and de Celis, J. F. (2011). MAP4K3 is a component of the TORC1 signalling complex that modulates cell growth and viability in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 6, e14528.
- Rhodes, J. T., Huff, C. A., Beachy, P. A. et al. (2007). Hedgehog signalling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4048-53.
- Ricci, R., Sumara, G., Sumara, I., Rozenberg, I., Kurrer, M., Akhmedov, A., Hersberger, M., Eriksson, U., Eberli, F. R., Becher, B. et al. (2004). Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Science* 306, 1558-61.
- Rooke, H. M. and Crosier, K. E. (2001). The smad proteins and TGFbeta signalling: uncovering a pathway critical in cancer. *Pathology* 33, 73-84.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O. and Clevers, H. (1998). The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608-12.
- Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Lavery, T., Rehm, J., Rubin, G. M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W. et al. (1998). Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* 125, 1049-57.
- Rosner, M., Hanneder, M., Siegel, N., Valli, A., Fuchs, C. and Hengstschlager, M. (2008). The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutat Res* 659, 284-92.
- Ruiz-Gomez, A., Molnar, C., Holguin, H., Mayor, F., Jr. and de Celis, J. F. (2007). The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs. *Biochim Biophys Acta* 1768, 901-12.
- Ruiz i Altaba, A., Sanchez, P. and Dahmane, N. (2002). Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2, 361-72.
- Sang, T. K. and Jackson, G. R. (2005). *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *NeuroRx* 2, 438-46.
- Sato, M., Kojima, T., Michiue, T. and Saigo, K. (1999). Bar homeobox genes are latitudinal prepatter genes in the developing *Drosophila notum* whose expression is regulated by the concerted functions of decapentaplegic and wingless. *Development* 126, 1457-1466.
- Schindler, C. W. (2002). Series introduction. JAK-STAT signalling in human disease. *J Clin Invest* 109, 1133-7.
- Schwanbeck, R., Martini, S., Bernoth, K. and Just, U. (2010). The Notch signalling pathway: Molecular basis of cell context dependency. *Eur J Cell Biol*.
- Schubbert, S., Shannon, K. and Bollag, G. (2007). Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 7, 295-308.

- Seidel, C., Schagdarsurengin, U., Blumke, K., Wurl, P., Pfeifer, G. P., Hauptmann, S., Taubert, H. and Dammann, R. (2007). Frequent hypermethylation of MST1 and MST2 in soft tissue sarcoma. *Mol Carcinog* 46, 865-71.
- Seto, E. S. and Bellen, H. J. (2004). The ins and outs of Wingless signalling. *Trends Cell Biol* 14, 45-53.
- Shilo, B. Z. (2003). Signalling by the Drosophila epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp Cell Res* 284, 140-9.
- Smith, W. W., Gorospe, M. and Kusiak, J. W. (2006). Signalling mechanisms underlying Abeta toxicity: potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 5, 355-61.
- So, E. Y. and Ouchi, T. (2010). The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci* 6, 675-81.
- Sorkin, A. and von Zastrow, M. (2009). Endocytosis and signalling: intertwining molecular networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 609-22.
- Sotillos, S. and De Celis, J. F. (2005). Interactions between the Notch, EGFR, and decapentaplegic signalling pathways regulate vein differentiation during Drosophila pupal wing development. *Dev Dyn* 232, 738-52.
- Stanisic, V., Lonard, D. M. and O'Malley, B. W. (2010). Modulation of steroid hormone receptor activity. *Prog Brain Res* 181, 153-76.
- Steinhardt, A. A., Gayyed, M. F., Klein, A. P., Dong, J., Maitra, A., Pan, D., Montgomery, E. A. and Anders, R. A. (2008). Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum Pathol* 39, 1582-9.
- Steinhauer, J. and Treisman, J. E. (2009). Lipid-modified morphogens: functions of fats. *Curr Opin Genet Dev* 19, 308-14.
- Stern, C. (1954). Two or three bristles. *Am. Scientist*, 213-247.
- Steventon, B., Araya, C., Linker, C., Kuriyama, S. and Mayor, R. (2009). Differential requirements of BMP and Wnt signalling during gastrulation and neurulation define two steps in neural crest induction. *Development* 136, 771-9.
- Stroschein, S. L., Wang, W., Zhou, S., Zhou, Q. and Luo, K. (1999). Negative feedback regulation of TGF-beta signalling by the SnoN oncoprotein. *Science* 286, 771-4.
- Su, G. H., Hilgers, W., Shekher, M. C., Tang, D. J., Yeo, C. J., Hruban, R. H. and Kern, S. E. (1998). Alterations in pancreatic, biliary, and breast carcinomas support MKK4 as a genetically targeted tumor suppressor gene. *Cancer Res* 58, 2339-42.
- Su, M. A., Wisotzkey, R. G. and Newfeld, S. J. (2001). A Screen for Modifiers of decapentaplegic Mutant Phenotypes Identifies lilliputian, the Only Member of the Fragile-X/Burkitt's Lymphoma Family of Transcription Factors in Drosophila melanogaster. *Genetics* 157, 717-725.
- Sumara, G., Belwal, M. and Ricci, R. (2005). "Jnking" atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci* 62, 2487-94.
- Sun, Y., Liu, X., Eaton, E. N., Lane, W. S., Lodish, H. F. and Weinberg, R. A. (1999a). Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signalling. *Mol Cell* 4, 499-509.
- Sun, Y., Liu, X., Ng-Eaton, E., Lodish, H. F. and Weinberg, R. A. (1999b). SnoN and Ski protooncoproteins are rapidly degraded in response to transforming growth factor beta signalling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12442-7.

- Tabata, T. and Kornberg, T. B. (1994). Hedgehog is a signalling protein with a key role in patterning *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 76, 89-102.
- Taguchi, A., Sawamoto, K. and Okano, H. (2000). Mutations Modulating the Argos-Regulated Signalling Pathway in *Drosophila* Eye Development. *Genetics* 154, 1639-1648.
- Taipale, J. and Beachy, P. A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411, 349-54.
- Tartaglia, M. and Gelb, B. D. (2005). Noonan syndrome and related disorders: genetics and pathogenesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 45-68.
- Tazi-Ahnini, R., Cork, M. J., Wengraf, D., Wilson, A. G., Gawkrödger, D. J., Birch, M. P., Messenger, A. G. and McDonagh, A. J. (2003). Notch4, a non-HLA gene in the MHC is strongly associated with the most severe form of alopecia areata. *Hum Genet* 112, 400-3.
- ten Dijke, P. and Arthur, H. M. (2007). Extracellular control of TGF $\beta$  signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 857-69.
- Thompson, B. J. (2010). Developmental control of cell growth and division in *Drosophila*. *Curr Opin Cell Biol* 22, 788-94.
- Tomoyasu, Y., Nakamura, M. and Ueno, N. (1998). Role of Dpp signalling in prepattern formation of the dorsocentral mechanosensory organ in *Drosophila melanogaster*. *Development* 125, 4215-4224.
- Towers, M. and Tickle, C. (2009). Generation of pattern and form in the developing limb. *Int J Dev Biol* 53, 805-12.
- Turenchalk, G. S., St John, M. A., Tao, W. and Xu, T. (1999). The role of lats in cell cycle regulation and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1424, M9-M16.
- Tyler, D. M., Li, W., Zhuo, N., Pellock, B. and Baker, N. E. (2007). Genes affecting cell competition in *Drosophila*. *Genetics* 175, 643-57.
- Urban, S., Lee, J. R. and Freeman, M. (2002). A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *EMBO J* 21, 4277-86.
- Ujike, H., Takehisa, Y., Takaki, M., Tanaka, Y., Nakata, K., Takeda, T., Kodama, M., Fujiwara, Y., Yamamoto, A. and Kuroda, S. (2001). NOTCH4 gene polymorphism and susceptibility to schizophrenia and schizoaffective disorder. *Neurosci Lett* 301, 41-4.
- Valanne, S., Wang, J. H. and Ramet, M. (2011). The *Drosophila* Toll signalling pathway. *J Immunol* 186, 649-56.
- van Der Heide, L. P., Hoekman, M. F. and Smidt, M. P. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J* 380, 297-309.
- van Slegtenhorst, M., de Hoogt, R., Hermans, C., Nellist, M., Janssen, B., Verhoef, S., Lindhout, D., van den Ouweland, A., Halley, D., Young, J. et al. (1997). Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science* 277, 805-8.
- Vargesson, N., Patel, K., Lewis, J. and Tickle, C. (1998). Expression patterns of Notch1, Serrate1, Serrate2 and Delta1 in tissues of the developing chick limb. *Mech Dev* 77, 197-9.

- Verheyen, E. M., Purcell, K. J., Fortini, M. E. and Artavanis-Tsakonas, S. (1996). Analysis of Dominant Enhancers and Suppressors of Activated Notch in *Drosophila*. *Genetics* 144, 1127-1141.
- Vidal, M. and Cagan, R. L. (2006). *Drosophila* models for cancer research. *Curr Opin Genet Dev* 16, 10-6.
- Vivekanand, P., Tootle, T. L. and Rebay, I. (2004). MAE, a dual regulator of the EGFR signalling pathway, is a target of the Ets transcription factors PNT and YAN. *Mech Dev* 121, 1469-79.
- Vu Manh, T. P., Mokrane, M., Georgenthum, E., Flavigny, J., Carrier, L., Semeriva, M., Piovant, M. and Roder, L. (2005). Expression of cardiac myosin-binding protein-C (cMyBP-C) in *Drosophila* as a model for the study of human cardiomyopathies. *Hum Mol Genet* 14, 7-17.
- Wackerhage, H. and Ratkevicius, A. (2008). Signal transduction pathways that regulate muscle growth. *Essays Biochem* 44, 99-108.
- Waeber, G., Delplanque, J., Bonny, C., Mooser, V., Steinmann, M., Widmann, C., Maillard, A., Miklossy, J., Dina, C., Hani, E. H. et al. (2000). The gene MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. *Nat Genet* 24, 291-5.
- Waite, K. A. and Eng, C. (2003). From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* 4, 763-73.
- Waltzer, L. and Bienz, M. (1998). *Drosophila* CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature* 395, 521-5.
- Waltzer, L. and Bienz, M. (1999). A function of CBP as a transcriptional co-activator during Dpp signalling. *EMBO J* 18, 1630-41.
- Wechsler-Reya, R. and Scott, M. P. (2001). The developmental biology of brain tumors. *Annu Rev Neurosci* 24, 385-428.
- Wei, J. and Hemmings, G. P. (2000). The NOTCH4 locus is associated with susceptibility to schizophrenia. *Nat Genet* 25, 376-7.
- Wesley, C. S. (1999). Notch and wingless regulate expression of cuticle patterning genes. *Mol Cell Biol* 19, 5743-58.
- Whitworth, A. J. and Russell, S. (2003). Temporally dynamic response to Wingless directs the sequential elaboration of the proximodistal axis of the *Drosophila* wing. *Dev Biol* 254, 277-88.
- Wright, V. M., Vogt, K. L., Smythe, E. and Zeidler, M. P. (2011). Differential activities of the *Drosophila* JAK/STAT pathway ligands Upd, Upd2 and Upd3. *Cell Signal* 23, 920-7.
- Wu, J. and Cohen, S. M. (2002). Repression of Teashirt marks the initiation of wing development. *Development* 129, 2411-8.
- Wu, M., Pastor-Pareja, J. C. and Xu, T. (2010). Interaction between Ras(V12) and scribbled clones induces tumour growth and invasion. *Nature* 463, 545-8.
- Yang, M., Nelson, D., Funakoshi, Y. and Padgett, R. W. (2004). Genome-wide microarray analysis of TGFbeta signalling in the *Drosophila* brain. *BMC Dev Biol* 4, 14.
- Zavadil, J. and Böttinger, E. P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 24, 5764-5774.
- Zecca, M. and Struhl, G. (2002). Subdivision of the *Drosophila* wing imaginal disc by EGFR-mediated signaling. *Development* 129, 1357-1368.
- Zender, L., Spector, M. S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S. T., Luk, J. M., Wigler, M., Hannon, G. J. et al. (2006). Identification and validation of



- oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* 125, 1253-67.
- Zeng, Q. and Hong, W. (2008). The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals. *Cancer Cell* 13, 188-92.
- Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L., Miyamoto, A., Weinmaster, G. and Hayward, S. D. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of Notch1C To facilitate Notch1C function. *Mol Cell Biol* 20, 2400-10.
- Zhu, H. and Lo, H. W. The Human Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (GLI1) Family of Transcription Factors in Gene Regulation and Diseases. *Curr Genomics* 11, 238-45.
- Zhu, H. J. and Burgess, A. W. (2001). Regulation of transforming growth factor-beta signalling. *Mol Cell Biol Res Commun* 4, 321-30.
- Zhu, J. and Mohan, C. (2010). Toll-like receptor signalling pathways--therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm* 2010, 781235.
- Zirin, J. D. and Mann, R. S. (2007). Nubbin and Teashirt mark barriers to clonal growth along the proximal-distal axis of the *Drosophila* wing. *Dev Biol* 304, 745-58.
- Zoncu, R., Efeyan, A. and Sabatini, D. M. (2011). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 21-35.







## Abreviaturas



°C: Grado Centígrado  
A: anterior  
ADN: Ácido Desoxirribonucleico  
ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario  
a-cv: anterior-crossvein  
AEL: After Egg Laying  
AER: Cresta Ectodérmica Apical  
*ap*: *apterous*  
APF: After Puparium Formation  
ARN: Ácido Ribonucleico  
AS: Antisentido  
ARN-i: Ácido Ribonucleico interferente  
BCIP: 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphatase  
BDGP: Berkeley Drosophila Genome Project  
BL: Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University  
BSA: Bovine Serum Albumine  
*brk*: *brinker*  
Cas3\*: Caspasa 3 activada  
*ck*: *crinkled*  
*CycA*: *Cyclin A*  
Dpp: Decapentaplegic  
D: Dorsal  
*Dfsal*: *Deficiencia sal*  
DL: Delta  
Dlg: Discs large  
EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético  
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor  
*en*: *engrailed*  
EST: Expression Sequence Tags  
*f*: *forked*  
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting  
FasIII: Fasciclin III  
FBS: Fetal Bovine Serum  
FLP: Flipase  
FRT: Flipase Recombination Target  
GFP: Green Fluorescent protein  
h: hora  
Hh: Hedgehog  
hs: heat-sock  
*iro-C*: Complejo *Iroquois*  
JNK: Jun N-terminal Kinases  
*kni-C*: *knirps*  
L1-6: Venas Longitudinales 1-6  
LB: Luria Bertani  
LiCl: Cloruro de Litio  
*M*: *Minute*  
M: Molar  
Mad: Mothers against dpp  
Med: Medea  
mg: miligramo  
MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de Magnesio

mM: Mili Molar  
N: Notch  
NaCl: Cloruro de Sodio  
NBT: 4-Nitro blue tetrazolium chloride  
NIG-FLY: Fly Stocks of National Institute of Genetics  
*nub: nubbin*  
*omb: optomotor-blind*  
P: Posterior  
PBS: Phosphate Buffered Saline  
PCR: Polimerase Chain Reaction  
p-cv-: posterior-crossvein  
Phall: Faloidina  
PH3: Fosfo-Histona3  
*pnt: punt*  
*puc: puckered*  
rpm: Revoluciones por minuto  
S: Sentido  
Sal: Spalt  
*salm: spalt major*  
*salr: spalt related*  
sd: desviación estándar  
SEM: Desviación estándar de la media  
*Shh: Sonic Hedgehog*  
*shn: schnurri*  
SSC: Saline Sodium Citrate  
*stg: string*  
TAE: Tris base, acetic acid, EDTA  
*tkv: thickveins*  
Tris-HCl: Tris Clorhídrico  
TS: Termosensible  
TSS: Transcription Start Site  
*tub: tubulina*  
UAS: Upstream Activating Sequence  
*ubi: ubiquitina*  
UCSC Genome Browser: University of California Santa Cruz Genome Browser  
μg: microgramo  
μl: microlitro  
V: Ventral  
VDRC: Vienna Drosophila RNAi Center  
*vg: vestigial*  
*vn: vein*  
*w: white*  
Wg: Wingless  
*y: yellow*  
ZPA: Zona de Actividad Polarizante







## Agradecimientos

